

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification: C12N 15/00, C12N 9/64, G01N 33/53	A2	(11) International Publication Number: WO 00/56871 (43) International Publication Date: 28 September 2000 (28.09.2000)
(21) International Application Number: PCT/EP00/02018		
(22) International Filing Date: 08 March 2000 (08.03.2000)		Published
(30) Priority Data: 199 10 108.6 08 March 1999 (08.03.1999) DE		
(60) Parent Application or Grant FAHRENHOLZ, Falk [/]; O. POSTINA, Rolf [/]; O. FAHRENHOLZ, Falk [/]; O. POSTINA, Rolf [/]; O. ISENBRUCK, Günter ; O.		
(54) Title: CELLS COEXPRESSING AN AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND AN 'alpha'-SECRETASE AND THEIR USES IN TEST METHODS AND DIAGNOSTICS (54) Titre: CELLULES COEXPRIMANT UNE PROTEINE PRECURSEUR AMYLOÏDE ET UNE 'alpha'-SÉCRÉTASE, ET LEURS UTILISATIONS DANS DES MÉTHODES D'ESSAI ET A DES FINS DE DIAGNOSTIC		
(57) Abstract		
The invention relates to a recombinant cell which expresses a substrate protein comprising at least one sequence region of 18 amino acids of the human amyloid precursor protein (APP) or a homologous protein. The sequence region contains the 'alpha'-secretase cleavage site as well as 6 amino acid rests at the amino terminal and 12 amino acid rests at the carboxy terminal, in relation to the 'alpha'-secretase cleavage site, and contains either a) a recombinant nucleic acid comprising at least one gene for a protease protein which contains either the sequence region(s), required for proteolytic action, of the disintegrin metalloprotease ADAM 10 obtained from cattle (Bos taurus), humans or another mammal or represents a mutein of a mammalian disintegrin metalloprotease ADAM 10 which has essentially the same enzymatic properties, the gene or genes being controlled by a heterologous promotor; or b) heterologous RNA coding for a substrate protein and a protease protein. The invention also relates to the use of the above cells.		
(57) Abrégé		
L'invention concerne une cellule recombinée exprimant une protéine substrat comprenant au moins une zone séquentielle de 18 aminoacides de la protéine précurseur amyloïde humaine (APP, amyloid precursor protein) ou une protéine homologue. La zone séquentielle comprend le point de clivage de la 'alpha'-sécrétase, ainsi que 6 restes aminoacide aminé-terminaux et 12 restes d'aminoacide carboxy-terminaux par rapport au point de clivage de la 'alpha'-sécrétase, et a) contient soit l'acide nucléique recombiné comprenant au moins un gène pour une protéine protéase qui comprend au moins la(s) zone(s) séquentielle(s) de disintégrine-métalloprotéase ADAM 10 issue du boeuf (Bos taurus), de l'homme ou d'un autre mammifère, ou bien représente une muteine d'une disintégrine-métalloprotéase ADAM 10 de mammifère, possédant sensiblement les mêmes propriétés enzymatiques, le gène ou les gènes se trouvant sous le contrôle d'un promoteur hétérologue; b) soit l'ARN hétérologue codant une protéine substrat et une protéine protéase. L'invention concerne en outre différentes utilisations de ces cellules.		

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12N 15/00, 9/64, G01N 33/53		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/56871 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. September 2000 (28.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02018		(81) Bestimmungsstaaten: AB, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 8. März 2000 (08.03.00)			
(30) Prioritätsdaten: 19910108.6 8. März 1999 (08.03.99) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: FAHRENHOLZ, Falk [DE/DE]; An der Klosterheck 17, D-55130 Mainz (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): POSTINA, Rolf [DE/DE]; Jahnstrasse 16, D-64380 Roßdorf (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter, Burlehrle Pagenberg Dost Altenburg Geissler Isenbrück, Theodor-Heuss-Anlage 12, D-68165 Mannheim (DE).			
(54) Title: CELLS COEXPRESSING AN AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND AN α-SECRETASE AND THEIR USES IN TEST METHODS AND DIAGNOSTICS			
(54) Bezeichnung: ZELLEN, DIE EIN AMYLOIDVORLÄUFERPROTEIN UND EIN α-SEKRETASE COEXPRIMIEREN UND DEREN ANWENDUNGEN IN TESTVERFAHREN UND DIAGNOSTIK			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a recombinant cell which expresses a substrate protein comprising at least one sequence region of 18 amino acids of the human amyloid precursor protein (APP) or a homologous protein. The sequence region contains the α-secretase cleavage site as well as 6 amino acid rests at the amino terminal and 12 amino acid rests at the carboxy terminal, in relation to the α-secretase cleavage site, and contains either a) a recombinant nucleic acid comprising at least one gene for a protease protein which contains either the sequence region(s), required for proteolytic action, of the disintegrin metalloprotease ADAM 10 obtained from cattle (<i>Bos taurus</i>), humans or another mammal or represents a mutein of a mammalian disintegrin metalloprotease ADAM 10 which has essentially the same enzymatic properties, the gene or genes being controlled by a heterologous promoter; or b) heterologous RNA coding for a substrate protein and a protease protein. The invention also relates to the use of the above cells.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft eine rekombinante Zelle, die ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfasst, wobei der Sequenzbereich die α-Sekretasespaltpstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α-Sekretasespaltpstelle enthält, und a) entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (<i>Bos taurus</i>), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfasst oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen, b) oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein. Die Erfindung betrifft weiterhin diverse Anwendungen der Zellen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TK	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SK	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Description

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

10

5

15

ZELLEN, DIE EIN AMYLOIDVORLÄUFERPROTEIN UND EIN α -SEKRETASE COEXPRIMIEREN UND
DEREN ANWENDUNGEN IN TESTVERFAHREN UND DIAGNOSTIK

20

10

25

Die Erfindung betrifft zunächst Zeller, die rekombinierte Nukleinsäure(n) enthalten, die ein Amyloidvorläuferprotein (APP) und eine α -Sekretase codieren, oder
15 zumindest Teile der genannten Proteine, ferner ein Testverfahren zur Identifikation von α -Sekretase-aktiver Substanzen sowie eines zur Identifikation weiterer Sekretasen, schließlich auch ein Verfahren zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere gegenüber *Morbus Alzheimer* sowie die Verwendung von Nukleinsäuren, die für eine α -Sekretase codieren, für
20 die Gentherapie.

35

Morbus Alzheimer ist die häufigste Ursache für Demenz in der westlichen Welt und die vierthäufigste Todesursache in den USA.

40

Die *Alzheimer*-Inzidenz steigt mit dem Alter: 1 bis 5 % der Menschen über 65 und
45 25 10 bis 20 % über 80 sind betroffen.

45

Alzheimer ist neuropathologisch durch die Anwesenheit einer Vielzahl von neuritischen Plaques und neurofibrillären Fehlstrukturen gekennzeichnet, die zu einem massiven Verlust an Neuronen führt. Weder die Plaques noch die neurofibrillären Fehlstrukturen sind spezifisch für *Alzheimer* – sie kommen bei älteren, intellektuell unauffälligen Personen und bei gewissen anderen Krankheiten ebenfalls vor. Allerdings sind diese Strukturen bei *Alzheimer* zahlreicher und weiter verbreitet als bei nicht betroffenen Individuen. Während Plaques extrazellulär auftreten,

55

5

findet man die neurofibrillären Fehlstrukturen in degenerierenden Neuronen. Der Hauptbestandteil der Plaques ist ein 39-43 Aminosäure (4kDa) großes Peptid, genannt β -Amyloid oder einfach β -Peptid ($A\beta$). Ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, Tau, ist der Hauptbestandteil der neurofibrillären Fehlstrukturen (Überblick: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Band 1, Seiten 42 bis 52, Herausgeber Meyers, Robert A., VCH Verlag Weinheim)

10

Das β -Peptid ($A\beta$) stammt von dem Amyloidvorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP) ab, einem Typ 1 Transmembranprotein, das in vielen Säugerzellen exprimiert wird.

15

Die $A\beta$ -Sequenz umfaßt 28 Aminosäuren des extrazellulären und 12 bis 15 Aminosäurereste des membran durchspannenden Teils von APP. $A\beta$ wird aus APP mittels proteolytischer Prozessierung durch eine bisher nicht identifizierte Protease gebildet, der β -Sekretase, die am Aminoterminus schneidet und durch die am C-Terminus schneidende γ -Sekretase.

20

Der Hauptabbauweg von APP ist der konstitutive sekretorische Weg, der die Spaltung des Proteins innerhalb der $A\beta$ -Sequenz durch eine putative α -Sekretase an der Zelloberfläche (Sisodia, S.S., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, Seiten 6075 bis 6079; Haass et al. (1992) Nature 357, Seiten 500 bis 503; Ikezu et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 10485 bis 10495) und im Trans-Golgi-System (Kuentzel et al. (1993) Biochem. J. 295, Seiten 367 bis 378; De Strooper et al. (1993) J. Cell Biol. 121, Seiten 295 bis 304; Sambamurti et al. (1992) J. Neurosci. Res. 33, Seiten 319 bis 329; Haass, et al. (1995) J. Cell. Biol. 128, Seiten 537 bis 547; Tomita et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 6277 bis 6284) umfaßt. Lösliche aminotermrale APP-Fragmente von 105 bis 125 kDa (sogenannte APP α -Fragmente; Weidemann et al. (1989) Cell 57, Seiten 115 bis 126; Evin et al. (1994) Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 1, Seiten 263 bis 280) werden ins extrazelluläre Medium freigesetzt. Das membrangebundene 10kDa große carboxyterminale Fragment (p10), das bei der α -Sekretase-Spaltung ebenfalls entsteht, enthält nur einen Teil des amyloidogenischen $A\beta$ -Peptids und kann durch die γ -

25

30

35

40

45

50

55

5

10

Sekretase zu einem 3kDa-Fragment (p3) weiter abgebaut werden (Haass et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, Seiten 3021 bis 3024). Da der Abbau von APP durch eine α -Sekretase zu keinem intakten A β -Peptid f \ddot{u} hrt, ist er nicht amyloidogenisch, d.h. er f \ddot{u} hrt nicht zur Bildung von Amyloidplaques und somit nicht zu

5 *Morbus Alzheimer.*

15

20

25

30

Aus diesem Grund steht der α -Sekretase-Abbau von APP seit Jahren im Fokus des Forscherinteresses. Durch Boseman et al. (1994) (J. Biol. Chem. 269, Seiten 3111 bis 3116) wurde ein Fusionsprotein aus dem aminoterminalen Teil von APP und einer alkalischen Phosphatase in H4-Zellen heterolog exprimiert, um die endogene α -Sekretaseaktivit \ddot{a} t dieser Zellen zu untersuchen und gegebenenfalls das entsprechende Protein zu identifizieren. Hierbei wurde der unter verschiedenen Bedingungen freigesetzte Anteil an Proteolyseprodukt mit Antikörpern bestimmt, die gegen alkalische Phosphatase gerichtet waren. Diese Versuche führten bisher nicht zur Identifikation der α -Sekretase. Vermutlich ist die Menge an endogener α -Sekretase zu gering, als daß eine direkte Isolierung und Identifikation der α -Sekretase m \ddot{o} glich w \ddot{a} re.

35

40

45

50

Es ist Aufgabe der Erfindung, Zellen bereitzustellen, die in der Lage sind, ein Amyloidvorl \ddot{a} uerprotein und eine α -Sekretase in ungewöhnlich großer Menge zu exprimieren. Eine weitere Aufgabe ist es, Zellen bereitzustellen, deren endogene α -Sekretaseaktivit \ddot{a} t vermindert ist. Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen anzugeben, die in den α -Sekretasestoffwechsel eingreifen, sowie ein Verfahren zur Identifizierung weiterer Sekretasen. Schlie β lich ist Aufgabe der Erfindung, ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere gegenüber *Morbus Alzheimer* anzugeben sowie ein Arzneimittel gegen neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere gegen *Morbus Alzheimer* bereitzustellen. Ferner sollen Tiermodelle wie transgene nicht-menschliche Tiere zum Studium von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* bereitgestellt werden.

Die Erfindung besteht in einer rekombinanten Zelle, die

55

5

ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und

15

- entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promoters stehen,
- oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.

20

10

25

15

30

Eine weitere Ausführungsform betrifft eine rekombinante Zelle, die rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend entweder

35

- mindestens ein Gen für ein Substratprotein, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und

40

- mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Ei-

50

55

5 genschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle ei-
nens heterologen Promoters stehen,
10 oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteasepro-
tein.

15 Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die an sich schon bekannte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 die Eigenschaften der authentischen α -Sekretase aufweist. Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind wurde zuerst von Chantry et al. (1989) (J. Biol. Chem. 264, Seiten 21603 bis 21607) gereinigt und von Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961) kloniert. Auch das Homologe des Menschen ist kloniert (Rosendahl et al. (1997), J. Biol. Chem. 272 (39), Seiten 24588 bis 24593, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer AF009615).

20 15 Es war bisher unbekannt, was das natürliche Substrat beider Enzyme *in vivo* ist. Es wurde nun gefunden, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10, soweit bisher bekannt, alle Eigenschaften der α -Sekretase aufweist, wodurch es nun möglich ist, Zellen herzustellen, die α -Sekretase zusammen mit APP in großen Mengen exprimieren.

25 30 20 Die erfundungsgemäßen Zellen sind vorzugsweise Säugerzellen, die mit Vektoren, die Nukleinsäuresequenzen enthalten, die für das Substratprotein und für das Proteaseprotein codieren, auf bekannte Weise stabil oder transient transfiziert wurden (bezüglich Transfektion siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York, USA). Es kann wahlweise ein 35 40 25 einziger Vektor verwendet werden, der die Expression zweier Proteine ermöglicht (z.B. pIREneo, Clontech, Palo Alto, California, USA) oder ein Gemisch aus zwei Vektoren, von denen jeder die Expression eines Proteintyps bewirkt. Alternativ können die Nukleinsäuren, die für das Substratprotein bzw. für das Proteaseprotein codieren, jeweils getrennt voneinander stabil oder transient transfiziert werden. Außerdem kommen virale Expressionssysteme, z.B. solche die auf SV40-45 50 30 Viren basieren, in Frage.

50

55

5

Ein anderes geeignetes Expressionssystem stellt die Injektion eines RNA-Gemisches in *Xenopus Oocytes* dar. In diesem Fall wird DNA, die für das erste bzw. zweite Protein codiert, in geeignete Vektoren kloniert, *in vitro*-transkribiert und als Transkriptgemisch in *Xenopus Oocytes* injiziert. In diesem Fall handelt es sich bei dem Begriff „rekombinante Nukleinsäure“ um heterologe RNA. Der Begriff „heterologe RNA“ bedeutet im Rahmen der Erfindung, daß die RNA sich von der endogenen RNA unterscheidet, da sie aus einem anderen Organismus stammt. Üblich ist es, in *Xenopus Oocytes* RNA zu injizieren, die aus Säugerzellen stammt, also heterolog in bezug auf *Xenopus* ist.

10

10 Auch Pflanzenzellen sind schon erfolgreich als Wirtszellsystem eingesetzt worden (Lüring und Witzeman (1995) FEBS. Lett. 361 (1), Seiten 65 bis 69). Ferner kann es sich bei der Zelle auch um eine Hefe, eine Insektenzelle oder um eine Bakterienzelle handeln.

15

15 Die erfindungsgemäßen Zellen, weisen den Vorteil auf, daß die α -Sekretase in solch gleichbleibend hoher Konzentration gebildet werden kann, daß der Nachweis des Proteolyseproduktes in reproduzierbarer und einfacher Weise erfolgen kann.

20

20 Dieser Vorteil wird dadurch bewirkt, daß durch entsprechende Wahl der rekombinanten Nukleinsäure(n) die Menge an Transkripten, die für das Proteaseprotein codieren, gesteuert werden kann. In der erfindungsgemäßen Zellen wird das Proteaseprotein also unter Zuhilfenahme rekombinater Methoden erzeugt.

35

Damit die Funktion der Protease verfolgt werden kann, müssen die erfindungsgemäßen Zellen ein Substratprotein exprimieren. Dies kann endogen erfolgen, das heißt der verwendete Zelltyp stellt natürlicherweise das Substratprotein über eine ausreichende Zeitspanne im Lebenslauf einer Zelle her, die die Beobachtung der

40

Funktion der Protease zuläßt. Hierbei ist zu beachten, daß das Substratprotein von praktisch jeder Säugerzelle gebildet zu werden scheint. Insbesondere exprimieren

45

auch Zellen aus Zelllinien wie HEK 293 ein Substratprotein (siehe Beispiel 8).

50

55

5

Auf besonders effektive Weise wird das Substratprotein durch rekombinante Methoden bereitgestellt. Hierdurch kann Substratprotein in weit größerer Menge produziert werden als dem endogenen Proteinspiegel entspricht (siehe Beispiel 11).

10

15

Es werden in der Regel Expressionsvektoren eingesetzt, die besonders starke Promotoren wie den Cytomegalie-Viruspromotor (CMV-Promotor) oder einen induzierbaren Promotor wie den MMTV-LTR-Promotor (Lee et al. (1981) Nature 294, Seite 228) besitzen. Diese Promotoren bewirken eine reproduzierbare und vergleichsweise starke Transkription der Gene, die für das Substratprotein bzw. das Proteaseprotein codieren.

20

25

Erfundungsgemäß ist es erforderlich, daß die rekombinante Zelle rekombinante Nukleinsäure(n) enthält, die mindestens ein für ein Proteaseprotein codierendes Gen aufweisen. Das Gen oder die Gene sind unter der Kontrolle eines heterologen Promotors, das heißt unter der Kontrolle eines Promotors, der die betreffenden Gene in ihrer natürlichen genetischen Umgebung nicht kontrolliert (Fremd-Promotor).

30

35

Vorzugsweise weisen die rekombinaten Nukleinsäure(n) zusätzlich ein Gen auf, das für ein Substratprotein codiert. Umfaßt die rekombinante Nukleinsäure(n) Gene, die für ein Substratprotein und ein Proteaseprotein codieren, so stehen mindestens das für ein Proteaseprotein codierende Gen, vorzugsweise aber beide Gene, d.h. das Gen für das Substratprotein und das Gen für das Proteaseprotein, unter der Kontrolle eines heterologen Promotors.

40

45

Der Begriff Gen bezeichnet im Rahmen der Erfindung einen DNA-Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, der für ein bestimmtes Protein oder Polypeptid codiert. Dieser Begriff erstreckt sich im Rahmen der Erfindung und abweichend vom normalen Sprachgebrauch auch auf die korrespondierende cDNA des Genomab-

50

55

5

schnitts. Die korrespondierende cDNA kann auf eine mRNA zurückgehen, die vollständig oder unvollständig gespleißt ist.

10

Andererseits kann durch die erwähnte Injektion *in vitro* transkribierter heterologer RNA in *Xenopus Oocyten* der Transkript-Spiegel direkt kontrolliert werden. Durch Steuerung des Transkriptspiegels gelingt eine Steuerung der Translation, also letztlich eine Steuerung der Menge an Genprodukt in der Zelle.

15

20

Bei dem Substratprotein handelt es sich entweder um das humane Amyloidvorläufigerprotein (APP, amyloid precursor protein, Schilling et al. (1991) Gene 98, Seiten 225 bis 230, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer X06989, Y00297) oder um ein homologes Protein aus einem anderen Organismus, das über mindestens 770 Aminosäuren mit dem humanen Gegenpart einer Sequenzidentität von 86 % auf Aminosäureebene aufweist. Das Protein kann auch jeweils nur einen Teil des APPs umfassen, der mindestens die putative α -Sekretasespaltstelle, bestimmt durch Esch et al. (1990) Science 248, Seiten 1122 bis 1124, umfaßt sowie die Bereiche des APP, die an der Erkennung der Spaltstelle durch die α -Sekretase beteiligt sind (siehe z.B. Sisodia (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, Seiten 6075 bis 6079). Das Wort Spaltstelle oder Schnittstelle bezeichnet den zwischen zwei Aminosäuren einer Proteinsequenz gelegenen Ort, an dem durch die Spaltung neue Termini entstehen. Durch Erzeugung von APP-Deletionsmutanten läßt sich auf einer dem Fachmann bekannten Weise die Erkennungsregion auf dem APP identifizieren. Das Substratprotein umfaßt somit in der Regel einen Sequenzbereich des APP oder eines Homologen, der die α -Sekretaseschnittstelle sowie die α -Sekretaseerkennungsregion beinhaltet. Hierbei wird ein Sequenzbereich von 6 Aminosäureresten, insbesondere von 36 Aminosäureresten aminoterminal und von 12 Aminosäureresten, insbesondere 83 Aminosäureresten carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretaseschnittstelle bevorzugt. Im Prinzip sind aber alle Proteine geeignet, die den Sequenzbereich aufweisen, der an der Erkennung der Spaltstelle durch die α -Sekretase beteiligt ist.

25

30

35

40

45

50

55

5

Das Proteaseprotein umfaßt mindestens den für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*) oder aus dem Menschen oder eines homologen Proteins. Alternativ kann das Proteaseprotein auch durch Mutation (Insertion, Deletion oder Austausch von Aminosäuren) aus einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 hervorgehen (Mutein bedeutet mutiertes Protein), solange die enzymatischen Eigenschaften im wesentlichen erhalten bleiben, das heißt denen des Wildtyps im wesentlichen entsprechen. Die Disintegrin-Metalloproteasen ADAM 10 aus Mensch und Rind sowie aus Maus und Ratte sind bevorzugt. Daneben fallen auch homologe Proteine unter die Definition des Proteaseproteins, die über 824 Aminosäuren mit der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind oder dem Menschen eine Sequenzidentität von 21 %, bevorzugt von 41 %, insbesondere von 61 %, vor allem von 81 %, am stärksten bevorzugt von 94 % auf Aminosäureebene aufweisen. Bevorzugt umfaßt das Proteaseprotein den Sequenzbereich von 213 bis 455, insbesondere von 213 bis 748, vor allem von 1 bis 748 bezogen auf die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Rinds in der maximal langen Form (*full length*) bzw. den Sequenzbereich von 213 bis 455, insbesondere von 213 bis 748 vor allem von 1 bis 748 bezogen auf die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Menschen in der maximal langen Form (*full length*).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Aufbindung pharmazeutischer Wirkstoffe.

Das erfundungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- 25 a) Bereitstellung eines oben beschriebenen Substratproteins,
- b) Bereitstellung eines oben beschriebenen Proteaseproteins,
- c) Applikation einer Testsubstanz auf eine Zelle, auf eine Zellfraktion oder auf ein Gemisch von Zellfraktionen, die jeweils sowohl das Substratprotein als auch das Proteaseprotein umfassen, und
- 30 d) Quantitative Bestimmung eines seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

5

Durch das erfundungsgemäße Verfahren ist es möglich, auf einfache und reproduzierbare Weise den Effekt von pharmazeutischen Wirksubstanzen auf die α -Sekretaseaktivität zu testen und auf diese Weise nach pharmazeutischen Wirksubstanzen mit vorteilhaften Wirkungen zu suchen. Zu den vorteilhaften Wirkungen, s die bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere *Morbus Alzheimer* von Interesse sein könnte, gehört insbesondere die Stimulation der α -Sekretaseaktivität der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von Substanzen, die die von der Zelle gebildete Proteinmenge oder die enzymatische Aktivität eines Proteaseproteins beeinflussen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer*.

25

15 Die Bereitstellung eines Substratproteins und eines Proteaseproteins wird in der Regel durch zeitgleiche Coexpression beider Proteine in den geeigneten Wirtszellsystemen auf bekannte Art und Weise bewerkstelligt. Gegebenenfalls ist die Induktion der Expression notwendig (bei induzierbaren Promotoren wie MMTV-LTR). Wurden Zellen transient transfiziert oder RNA injiziert, so werden die Zellen zum Zeitpunkt der höchsten Expressionsdichte entnommen.

20 Das Verfahren kann mit intakten Zellen durchgeführt werden. In diesem Falle wird die Testsubstanz dem Kulturmedium zugegeben und die seit der Zugabe der Testsubstanz gebildete Menge an Proteolyseprodukt des Substratproteins im Zellüberstand bestimmt. Alternativ können die Zellen aufgebrochen werden, wobei die Testsubstanz einer Zellfraktion oder einer Mischung aus Zellfraktionen zugesetzt wird, die sowohl das Substratprotein als auch das Proteaseprotein umfasst. Sollen Zellfraktionen eingesetzt werden, so ist es theoretisch auch möglich, Substratprotein und Proteaseprotein getrennt in zwei Zelllinien zu exprimieren, die Zellen aufzubrechen und die Membranfraktionen zu vereinigen. Bei Einsatz von Zellfraktionen erfolgt die quantitative Bestimmung des seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes nach Zentrifugation der Probe im Membranüberstand.

50

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteaseproteins zur proteolytischen Spaltung eines erfindungsgemäßen Substratproteins.

10

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante Zelle enthaltend eine rekombinante Nukleinsäure(n), die codieren:

15

a) für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier und

20

b) gegebenenfalls für ein Substratprotein.

25

Dominant negative Formen der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 können durch Punktmutation in einem besonders konservierten Bereich, insbesondere im aktiven Zentrum des Enzyms, erhalten werden. Ein Beispiel für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 ist die Mutante E384A der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Rindes, die in den Beispielen beschrieben und hier besonders bevorzugt ist. Entsprechende Mutanten aus Mensch oder einem anderen Säugetier sind ebenfalls bevorzugt. Die rekombinanten Zellen weisen den Vorteil auf, daß durch die Expression der dominant negativen Form die endogene α -Sekretaseaktivität fast vollständig ausgeschaltet, was sich in einer verminderten proteolytischen Spaltung des ebenfalls exprimierten Amyloidvorläuferproteins äußert. Dies erleichtert die Suche nach neuen Sekretasen.

30

35

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auffindung weiterer Sekretasen oder pharmazeutischer Wirkstoffe, umfassend die folgenden Schritte

40

a) Expression eines Substratproteins und einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier in einer oben beschriebenen Zelle.

45

50

55

5

- 10 b) Expression eines weiteren Testproteins in der Zelle und/oder Applikation einer Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle, und
- 5 c) Quantitative Bestimmung eines gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

15

Dieses Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 die endogene α -Sekretaseaktivität einer Zelle, die dieses Protein exprimiert, unterdrückt. Erfolgsgemäß werden in diesem Verfahren nur Zellen oder Zellmembranen verwendet, die die dominant negative Form aufweisen.

20

Das Testprotein wird unter Anwendung der dem Fachmann bekannten Techniken in derselben Zelle exprimiert, die auch das Substratprotein und die dominant negative Form coexprimiert. Bei dem Verfahren wird geprüft, ob die Expression des Testproteins die Menge pro Zeiteinheit gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins erhöht. Ist dies der Fall, so ist dies ein starker Hinweis darauf, daß es sich bei dem Testprotein um eine Sekretase handelt, die sich von der α -Sekretase bzw. von der Disintegrin-Metalloproteinase ADAM 10 unterscheidet. Durch Versuche mit künstlichen Peptiden (etwa gemäß Fig. 3) läßt sich klären, ob das Testprotein selber eine Protease/Sekretase ist oder die Aktivität einer Protease nur beeinflußt. Ferner kann eine Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle gegeben werden, um festzustellen, ob die Testsubstanz die Aktivität der Sekretase, die keine α -Sekretase bzw. nicht die Disintegrin-Metalloproteinase ADAM 10 ist, beeinflußt.

25

30

35

40

45

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier oder einer Nukleinsäure, codierend für eine dieser dominant negativen Formen, zur Unterdrückung der α -Sekretaseaktivität einer Zelle.

50

Bei einer bevorzugten Form einer erfundungsgemäßen Zelle codiert eine rekombinante Nukleinsäure ein Substratprotein, das ein Fusionsprotein aus einem Marker-

5

protein oder einem Enzym und dem Amyloidvorläuferprotein darstellt. Der aminotermrale Sequenzbereich des Fusionsproteins wird von dem Markerprotein (wie GFP, *Green fluorescent Protein*), einem Enzym oder dem katalytisch wirksamen Teil eines Enzyms und der carboxyterminale Sequenzbereich vom Amyloidvorläuferprotein oder einem Teil des Amyloidvorläuferproteins gebildet.

10

15

Bei einer bevorzugten Form der erfindungsgemäßen Zelle handelt es sich bei dem Enzym um die alkalische Phosphatase SEAPs, der gegenüber der Wildtyp-Variante SEAP die 24 carboxyterminalen Aminosäuren fehlen (SEAP : Soluble Human Secreted Alkaline Phosphatase). Diese SEAP-Variante ist verkürzt, um die Anheftung des Enzyms über GPI-Kopplung zu verhindern. Nukleinsäure, die für SEAP codiert, ist kommerziell erhältlich (pSEAP, Tropix Corp., Belford, Massachusetts, USA, Genbank-Zugangsnummer U09660).

20

25

30

35

Bei einer bevorzugten Form der erfindungsgemäßen Zelle codiert eine rekombinante Nukleinsäure für ein Substratprotein, das eine Sequenz gemäß SEQ ID-No.:1 aufweist. Dieses Protein stellt ein Fusionsprotein aus SEAPs und den 119 carboxyterminalen Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP₁₁₉) dar. Dieses Protein wird z.B. von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID-No.:2 codiert. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil eines Expressionsvektors sein z.B. gemäß Vektor 136.1 (pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉, siehe Fig. 1) oder gemäß Vektor 137.11 (pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉_ADAM10-HA, siehe Fig. 2).

40

45

50

Bei einer bevorzugten Ausführungsform eines der erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen enzymatischen Test, bei dem von der katalytischen Aktivität der Probe auf die Menge an Proteolyseprodukt geschlossen wird. Dies Verfahren kann z.B. unter Verwendung von erfindungsgemäßen Zellen durchgeführt werden, die ein Substratprotein gemäß SEQ ID-No.:1 exprimieren. Durch die α -Sekretaseaktivität der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wird der aminotermrale Teil des Substratproteins abgespalten. Da dieses Proteolyseprodukt alkalische Phosphataseaktivität hat, lässt es sich im Zell- oder Membranüberstand z.B. durch Chemilumineszenz

5

nachweisen. Hierbei können handelsübliche Testsysteme wie Phospha-Light™ von Tropix Corp. (Belford, Massachusetts, USA) verwendet werden.

10

Die Abtrennung des Zellüberstands oder des Zellmembranüberstands nach Applikation der pharmazeutischen Wirksubstanz hat so zu erfolgen, daß sich die spezifische enzymatische Aktivität des Proteolyseproduktes durch den Abtrennvorgang nicht ändert oder sich in reproduzierbarer Weise ändert, so daß Proteolyseproduktmenge und katalytische Aktivität korreliert werden kann.

15

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eines der erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen spektroskopischen Test (wie Fluorometrie), bei dem von der spektroskopischen Eigenschaft einer Probe (wie Fluoreszenz) auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird. Diese Ausführungsform bietet sich an, wenn das Substratprotein ein Fusionsprotein aus einem fluoreszierenden Protein (wie GFP) und dem Amyloidvorläuferprotein darstellt.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahrenen zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für Morbus Alzheimer.

25

Bei diesem Verfahren wird eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz eines spezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Polymerasekettenreaktionsanalyse (PCR-Analyse, PCR-Reaktion) unterworfen, das Amplifikationsprodukt ggf. sequenziert und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen. Die Anzahl und Position der Sequenzunterschiede, die sich in einer anderen Aminosäurabfolge äußern, läßt Rückschlüsse auf den Risikofaktor für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für Morbus Alzheimer zu. Hierbei wird angenommen, daß Sequenzunterschiede, die zu einer Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Variante mit beeinträchtigter α-Sekretaseaktivität führen, eine Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für Morbus Alzheimer zur Folge haben. Ferner kann das Amplifikationsprodukt einer Schmeizpunktanalyse unterzogen und auch auf diese Weise mit der bekannten Sequenz verglichen werden. Für diesen Zweck werden

30

35

40

45

50

55

5

Temperaturgradienten-Gelelektrophorese und fluoreszenzspektroskopische Methoden eingesetzt (z.B. TGGE-System der Fa. Biometra, LightCyclerTM der Fa. Hoffmann-LaRoche). Darauf aufbauend können spezifische Gensonden gegen humanes ADAM 10 oder dessen mutierte Varianten für diagnostische Zwecke eingesetzt werden (z.B. im Rahmen der FISH-Technik (*fluorescent in situ hybridisation*) oder mit Hilfe von DNA-Chips). Als Gensonden kommen Nukleinsäure- oder Peptid-Nukleinsäureoligomere in Betracht.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, wobei

15

- a) eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz gensepezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der PCR-Analyse unterworfen wird,
- b) und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen wird.

20

Mit Hilfe von Gensonden wurde der chromosomale Lokus von humanem ADAM 10 auf Chromosom 15 bei 12.44 cR3000 zugeordnet (Yamazaki et al. (1997) *Genomics* 45, Seiten 457-459). Durch chromosomale Translokation oder auch durch Alleldeletion in Chromosomen (Bsp. Tumorsuppressor p53) kann es zu einem Aktivitätsverlust von Genprodukten kommen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere *Morbus Alzheimer* durch einen Aktivitätsverlust der ADAM 10-Protease bedingt wird, welcher aus einer chromosomal Veränderung resultiert. Durch Verwendung von ADAM 10-Gensonden ließe sich ein Fehlen oder eine falsche Lokalisierung des ADAM 10-Gens bestimmen und als diagnostischer Parameter einer Prädisposition für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* nutzen.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, wobei die tatsächliche chromosomal Lokalisierung des Gens der

30

35

40

45

50

55

5

Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit seiner normalen chromosomalen Lokalisierung, Chromosom 15 bei 12.44 cR₃₀₀₀, verglichen wird.

10

Eine Verringerung der Aktivität der ADAM 10-Protease kann darüber hinaus durch eine verminderte Transkription des ADAM 10-Gens bedingt werden. Die Effizienz der Transkription des ADAM 10-Gens läßt sich durch die Quantifizierung der ADAM 10-mRNA ermitteln und als Parameter bei der Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* oder auch zur Diagnose einer Prädisposition dieser Krankheiten nutzen. Dazu muß die

20

ADAM 10-mRNA aus Zell- oder Gewebeproben isoliert und quantifiziert werden. Zur direkten Quantifizierung der mRNA bietet sich die sogenannte Northern-Blot-Analyse an. Eine z.B. radioaktiv markierte, zur ADAM 10-mRNA komplementäre Nukleinsäuresonde hybridisiert dabei mit der ADAM 10-mRNA. Die Menge an spezifisch gebundener Sonde wird anschließend, nach dem Fachmann bekannten Methoden, quantifiziert. Die ADAM 10-mRNA kann nach bekannten Methoden zunächst in einzelsträngige, komplementäre DNA und dann in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Sowohl die einzelsträngige als auch die doppelsträngige DNA läßt sich durch dem Fachmann bekannte Methoden, wie z.B. Echtzeit-PCR, DNA-Mikro-Array-Analyse, DNA Chip-Technologie etc., quantifizieren.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, durch quantitative Bestimmung der mRNA-Mengen von humanem ADAM 10 aus Zell- und Gewebeproben, umfassend einen der folgenden Schritte:

35

- 25 a) Isolierung und Quantifizierung der ADAM 10-mRNA,
- b) Einzel- oder doppelsträngige cDNA die ADAM 10-mRNA umgeschrieben wird welche dann quantifiziert wird,
- c) die ganze Nukleotidsequenz von ADAM 10 oder Teile davon zur Quantifizierung mittels Hochdurchsatz-Expressionsanalyse (z.B. DNA-Chip-Technologie u. DNA-Micro-Array) eingesetzt wird.

40

45

50

55

5

Die α -Sekretaseaktivität von ADAM 10 läßt sich durch Aktivatoren der Protein-
kinase C stimulieren. ADAM 10 besitzt in seinem Carboxylterminus einen Thre-
oninrest in Aminosäureposition 719 (T719), welcher eine Proteinkinase C-
Phosphorylierungsstelle darstellt. Es ist naheliegend, daß die Aktivität von
ADAM 10 durch Phosphorylierung an Threonin 719 gesteigert wird. Für den Ak-
tivitätsverlust von ADAM 10 könnte daher eine fehlende, oder zumindest eine
verminderte, Phosphorylierung von ADAM 10 verantwortlich sein. Methoden,
mit denen der Phosphorylierungsgrad von ADAM 10 bestimmt werden kann,
können daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere
von *Morbus Alzheimer* und zur Diagnose einer Prädisposition dieser Krankheiten
angewendet werden. Die Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von
ADAM 10 kann an Zell- oder Gewebeproben durchgeführt werden oder auch an
aus diesen Proben isoliertem ADAM 10 erfolgen. Durch zweidimensionale Po-
lyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließenden Elektrotransfer kann ADAM
10, getrennt von anderen Proteinen einer Zell- oder Gewebeprobe, auf protein-
bindenden Membranen dargestellt werden. Die Phosphorylierung von ADAM 10
läßt sich anschließend, gegebenenfalls nach Tryptischem-Verdau, durch Massen-
spektrometrie, durch Anti-Phosphothreonin-Antikörper oder durch noch zu ent-
wickelnde Anti-Phospho-ADAM 10-Antikörper quantifizieren. Mit den gleichen
Methoden läßt sich auch der Phosphorylierungsgrad von gereinigtem ADAM 10
ermitteln. Es können auch Experimente herangezogen werden, mit denen man die
Menge an Phosphothreonin bestimmt, bzw. bei denen man eine Dephosphorylie-
rung von Phospho-ADAM 10 nach bekannten Methoden quantitativ durchführt
(Ausubel et al. (Hrsg.) (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wi-
ley & Sons, New York).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit Verfahren zur Bestimmung des
Aktivitätszustands von humanem ADAM 10 durch Quantifizierung des Phospho-
rylierungsgrades von humanem ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben, wobei
entweder

45

50

55

5

10 a) ADAM 10 isoliert wird und sein Phosphorylierungsgrad entweder durch Massenspektrometrie, durch spezifische Anti-Phosphothreonin-Antikörper, durch Quantifizierung der Aminosäure Phosphothreonin oder durch Dephosphorylierung (Phosphatase-Assay) von ADAM 10 bestimmt wird, oder

15 b) Zell- oder Gewebeproben direkt in eine Proteomanalyse eingesetzt werden und der Nachweis von phosphoryliertem ADAM 10 wie unter Punkt a) beschrieben erfolgt.

20

10 Zum generellen Nachweis und zur Quantifizierung von ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben bieten sich darüber hinaus spezifische, ADAM 10 erkennende Antikörper und Antikörperderivate an. Unter Antikörperderivaten werden hier rekombinante Einzelketten-Antikörper und auch rekombinante Phagen verstanden, die rekombinante Einzelketten-Antikörper enthalten. Spezifisch ADAM 10 erkennende Antikörper können daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* und zur Feststellung einer Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* verwendet werden.

35

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind somit Antikörper oder Antikörperderivate, die ein Proteaseprotein spezifisch binden.

40

Folgende transgene nicht-menschliche Tiere sind weitere erfindungsgemäße Ge-

genstände.

25 a) Transgenes nicht-menschliches Tier, das rekombine Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier aufweist.

30 b) Transgenes nicht-menschliches Tier, aufweisend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure.

50

55

5

Transgene Tiere können im Rahmen der Erfindung homozygot oder heterozygot in bezug auf das Gen sein, das dem Tier die transgene Eigenschaft verleiht. Außerdem sind von dem Begriff „transgenes Tier“ Menschen nicht umfaßt.

10

Transgene Tiere werden auf an sich bekannte Weise erzeugt. Hierbei wird bei 5 einer Ausführungsform von Tier a) rekombinante Nukleinsäure verwendet, z.B. in Form eines Vektors, die für ein Proteaseprotein codiert. Bei einer anderen wird rekombinante Nukleinsäure verwendet, z.B. in Form eines Vektors, die für eine dominat negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (Bos taurus), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier codiert.

15

Bei Tier b) wird eine sogenannte *antisense*-Nukleinsäure verwendet, die über einen Bereich von mindestens 10 Basen (vorzugweise 15, insbesondere 20 oder 30 Basen) einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers (auch eines Menschen) codiert, komplementär ist, d.h. an die Nukleinsäure binden kann.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Tiere a) und b) als Tiermodelle für die Suche und die Erprobung von pharmakologischen Wirkstoffen gegen neurodegenerative Erkrankungen, speziell gegen *Morbus Alzheimer*. Weiterhin können physiologische Veränderungen oder Verhaltenseigenarten der Tiere Ausschluß darüber geben, welche Prozesse oder Entwicklungsstadien eines Organismus durch ADAM 10 beeinflußt werden.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer rekombinaten Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (Bos taurus), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier zur Erzeugung transgener Zellen und transgener nicht-menschlicher Tiere und zur Gentherapie.

30

Die Verwendung einer Nukleinsäure, die für die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Menschen codiert, ist bevorzugt. Bei der Konstruktion des Vektors für die Gentherapie wird die Nukleinsäure gegebenenfalls über eine Mehrfach-schnittstelle (*multiple cloning site*) in den Vektor so eingebaut, daß in einer Zelle,

35

55

5

10

15

die mit dem so konstruierten Vektor transfiziert ist, Expression der rekombinanten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 feststellbar ist. Durch das Einschleusen von Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 oder eines katalytisch aktiven Teils derselben in die Zielzellen im Rahmen der Gentherapie können α-Sekretaseaktivitätsdefekte von Zellen kompensiert werden. Dadurch können die Symptome von *Morbus Alzheimer* und anderer neurodegenerativer Erkrankungen zurückgedrängt werden.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen (vorzugeweise 15, insbesondere 20 oder 30 Basen) komplementäre rekombinante Nukleinsäure zur Erzeugung von transgenen Zellen und transgenen nichtmenschlichen Tieren und zur Gentherapie.

25

30

35

40

45

50

15 Ebenfalls zur Erfindung gehört also auch die Erzeugung von transgenen Tieren, bei denen eine ADAM 10-Protease, eine dominant negativ wirkende Mutante derselben, oder eine zur ADAM 10-DNA-Sequenz entgegengesetzt komplementäre (revers komplementäre) Nukleinsäure zusätzlich exprimiert bzw. transkribiert wird. Die zu transkribierende Nukleotidsequenz kann dabei unter Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promoters wie z.B. dem Cytomegalie-Viruspromotor (CMV-Promotor) stehen. Mit diesem ist eine Expression in allen Geweben möglich. Alternativ kann die zu transkribierende Nukleotidsequenz unter Kontrolle eines gewebsspezifischen Promoters stehen. Von besonderem Interesse sind hier solche Promotoren, die eine gehirnspezifische Expression erlauben, insbesondere solche, die für Neuronen und Gliazellen spezifisch sind. Unter Verwendung des Promoters des Thy1-Glykoproteins der Maus gelang es beispielsweise, das humane Amyloid-Vorläuferprotein in Neuronen von Mäusen zu exprimieren (Moechars et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, Seiten 6483-6492). In Analogie hierzu könnte eine ADAM 10-Protease, deren dominant negative Form oder eine entgegengesetzte komplementäre Form in Neuronen von Mäusen entweder alleine oder zusammen mit Varianten des humanen Amyloid-Vorläuferproteins exprimiert werden. Sol-

5

che transgenen Tiere können als Modellsysteme zum Testen und Auffinden von Pharmaka und zur Untersuchung der Amyloidprozessierung verwendet werden. Die Überexpression einer proteolytisch aktiven ADAM 10-Protease sollte dabei die Entstehung von Amyloid- β -Peptiden verhindern bzw. zumindest verlangsamen. Die Expression einer dominant negativ wirkenden ADAM 10-Mutante sollte die Aktivität der endogenen ADAM 10-Protease hemmen und damit zu einer vermehrten Entstehung von Amyloid- β -Peptiden beitragen. Eine zweite Strategie zur Ausschaltung der endogenen ADAM 10-Protease stellt die Transkription einer zur ADAM 10-cDNA entgegengesetzten komplementären DNA dar. Mit dieser so genannten *antisense*-Strategie ist es möglich, die Expression eines endogenen Proteins in Zellkultur zu unterdrücken (siehe z.B. Volonte et al. (1999) FEBS Lett. 445, Seiten 431-438). Das Ausschalten von Genen ist mit einem solchen Ansatz auch *in vivo* möglich (siehe z.B. Hayashi et al. (1996) Gene Therapie 5, Seiten 878-885).

10

15

20

25

Ein weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel, das eine rekombinante Nukleinsäure enthält, die für ein erfundungsgemäßes Proteaseprotein codiert.

30

Ein solches rekombinantes Arzneimittel ist z.B. ein Virus oder ein Vektor für die Gentherapie, der Nukleinsäure, die für ein erfundungsgemäßes Proteaseprotein codiert, aufweist.

35

Als Arzneimittel kann weiterhin ein katalytisch aktiver, löslicher Proteinanteil von ADAM 10 dienen. Dieses Polypeptid wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden rekombinant z.B. in Bakterien, Insektenzellen, Hefen oder eukaryontischen Säugerzellen hergestellt und in reiner Form isoliert. Die Applizierung dieses ADAM 10-Polypeptids erfolgt bevorzugt durch Injektion oder durch Resorption.

40

45

30 Die Erfindung wird durch die nachfolgende Zeichnung näher erläutert.

50

55

5

Es zeigt

10

Fig. 1 den Expressionsvektor 136.1, der für ein Substratprotein codiert, das ein Fusionsprotein aus SEAPs und APP₁₁₉ darstellt.

5

15

Fig. 2 den Expressionsvektor 137.11, der außer für das vorgenannte Fusionsprotein für ein Proteaseprotein codiert, welches aus einer markierten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 besteht.

20

Fig. 3 die proteolytische Spaltung von Peptiden, die die α -Sekretaseschnittstelle von APP aus dem Rind umfassen, durch Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

25

Fig. 4 die Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

30

Fig. 5 die Sekretion von APP α von unveränderten HEK-Zellen (HEK 293, kurz HEK steht für *human embryonic kidney*) und von HEK-Zellen, die die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren (HEK-ADAM 10-Zellen).

35

Fig. 6 den Einfluß des Metalloprotease ADAM 10 auf die Entstehung der Protoplyseprodukte APP α und p10.

40

Fig. 7 den inhibierenden Effekt der dominant negativen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (DN).

45

Fig. 1 zeigt den Vektor 136.1, der auf einem pcDNA3-Vektor (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) basiert und in den eine Nukleinsäure einkloniert wurde, die für ein Protein gemäß SEQ ID-No.:1 codiert. Zur Konstruktion der Nukleinsäure wurde der Bereich, der die ersten 506 aminoterminalen Aminosäuren von SEAP codiert, durch PCR amplifiziert (Produkt: SEAPs-DNA). Als Matrize wur-

55

5

de der Vektor pSEAP (Tropix Corp., Belford, Massachusetts, USA) benutzt. Durch PCR wurde eine BsrGI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Die codierende Region für die letzten 119 carboxyterminalen Aminosäuren des menschlichen Amyloidvorläuferproteins wurden durch PCR auf der korrespondierenden cDNA amplifiziert (Produkt: APP₁₁₉-DNA). Durch PCR wurde eine BsrGI-Schnittstelle am 5'-Ende der cDNA eingeführt. Die BsrGI-Schnittstellen der SEAPs-DNA und APP₁₁₉-DNA wurden für die Konstruktion einer Nukleinsäure eingesetzt, die für das SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsprotein gemäß SEQ ID-No.:1 codiert, eingesetzt.

10

15

Fig. 2 zeigt den Vektor 137.11, der Sequenzbereiche enthält, die für das vorgenannte Fusionsprotein und eine mit einem Marker (Influenza Hämaggglutinin (HA) Epitop tag) markierte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Variante codieren. 137.11 basiert auf dem Vektor pcDNA3 der Firma Invitrogen.

20

25

30

35

40

45

Fig. 3 zeigt die proteolytische Spaltung von Peptiden, die die Stelle der α -Sekretasespaltung von APP durch ADAM 10 umspannen.

(A) Ordinate: relative Absorption [220 nm], Absisse: Zeit [min]. Peptidsubstrate wurden in Spaltungspuffer in Abwesenheit (linker Graph) oder in Anwesenheit von ADAM 10 (rechter Graph) 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend der HPLC-Analyse unterzogen. Die Sterne kennzeichnen die Peptidsubstrate und die Zahlen, die generierten Produkte: 1 : EVHHQK-OH; 2 : LVFFAEDVGSNK-NH₂; 3 : LVFFGEDVGSNK-NH₂.

(B) CD-Spektren von APP-Peptiden. Ordinate: Elliptizität [θ] (deg $\times 10^3$); Absisse: Wellenlänge [nm]. Die Peptide wurden in 20 mM Tris/HCl pH 8,3, 250 mM NaCl bei einer Endkonzentration von 0,5 mM gelöst. Die Messungen wurden in Gegenwart von 0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS) ausgeführt.

Fig. 4 zeigt die Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10

(A) nach Transfektion von HEK-Zellen und HEK-APP₆₉₅-Zellen mit ADAM 10-cDNA wurden Zellslysate mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper immuno-precipitiert, der Deglycosilierung mit PNGase F (Spur 3) unterworfen oder

50

55

5

direkt durch ein 4-12 % NuPAGE-Gelsystem und Western Blot analysiert.
HEK-APP₆₉₅-Zellen sind HEK-Zellen, die ein humanes 695 Aminosäuren
großes Amyloidvorläuferprotein (GenBank/EBML-Datenbank-Zugangs-
nummer: Y00264) exprimieren. Immunoblots wurden mit dem ECL-
Detektionssystem (Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen) durchgeführt.

10

(B) HEK und HEK-ADAM-10-Zellen wurden mit 0,3 mg/ml Sulfo-NHS-LC-
Biotin (Pierce, Rockford, Illinois, USA) in PBS 30 min bei 4°C inkubiert.
Nach Immunopräzipitation mit dem monoklonalen Anti-HA-Antikörper
(16B12) und Elution des Immunkomplexes wurden 4/5 des Eluats mit Strep-
15 tavidin (a), inkubiert, während das verbliebene Fünftel direkt einer 10 %-igen
SDS-PAGE unterworfen wurde (b) und anschließend auf PVDF-Membranen
geblottet wurde. Die Detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

15

20

20

25

Fig. 5 zeigt die Sekretion von APP_α von HEK- und HEK-ADAM-10-Zellen.

25

15 (A) Die Zellen wurden in Gegenwart der bezeichneten Verbindung inkubiert.
Nach 4 Stunden wurde das Medium gesammelt, die Proteine präzipitiert und
einer Immunoblotanalyse mit dem monoklonalen Antikörper 6E10, gefolgt
30 von einem sekundären [³⁵S]-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörper, unterzo-
gen.

30

35 (B) Quantitative Analyse des sekretierten APP_α. Die APP_α entsprechenden
radioaktiven Banden wurden mit Hilfe eines Bio-Imaging Analyzer BAS-
1800 quantifiziert. Die Meßwerte wurden wie in dem Beispiel beschrieben,
auf verschiedene Proteinmengen normiert. Die Ergebnisse wurden als Pro-
40 zentwerte von sekretiertem APP_α in nicht-rekombinanten Vergleichs-HEK-
45 Zellen ausgedrückt und die Standardabweichungen aus mindestens drei un-
abhängigen Experimenten angegeben. Ordinate: Sekretion von APP_α [Pro-
zentwert der Wirkung in HEK-Zellen]. Absisse: Probennummer, dieselbe
Numerierung wie in (A).

35

50 (A) Fig. 6 zeigt den Einfluß der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auf die Ent-
stehung der Proteolyseprodukte APP_α und p10.

50

55

5

(A) HEK und HEK-ADAM-10-Zellen wurden mit 200 μ Ci/ml [35 S] L-Methionin

10

und Cystein fünf Stunden metabolisch markiert. Die Kulturmedien wurden mit dem polyclonalen Antikörper 1736 immunoprezipitiert und einer 10 %-igen SDS-PAGE unterzogen. Die Analyse wurde mit dem Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 durchgeführt. APP_{751,α} bezeichnet das Proteolyseprodukt, das durch α -Sekretase-Einwirkung auf eine APP-Variante, welche 751 Aminosäuren umfasst, entsteht.

15

(B) Die Zellsäfte wurden mit dem Antikörper C 7 immunoprezipitiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 10 – 20 %-igen Tris-Tricine Gel (Novex) getrennt und wie oben beschrieben analysiert.

20

(C) Quantitative Analyse von intaktem APP, das die ganze Länge aufweist (Holo-APP), und p10. Die entsprechenden radioaktiven Banden wurden wie in Fig. 5 quantifiziert. Die Werte von p10 wurden auf die Holo-APP-Spiegel normiert. Die Ergebnisse vier unabhängiger Experimente wurden mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Die statistische Signifikanz zwischen Vergleichszellen und HEK-ADAM-10-Zellen wurde mit Hilfe des ungepaarten Student's *t*-Test bestimmt (*, P<0,005).

25

Fig. 7 zeigt den inhibierenden Effekt der dominant negativen Mutante DN der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

30

(A) Endogene Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen. ADAM 10 mRNA von MDBK und HEK-Zellen wurde mit einem Oligonukleotid, das spezifisch für die bovine und die humane ADAM 10 mRNA ist, revers transkribiert und anschließend amplifiziert, was Fragmente mit 541 Basenpaaren ergab. Als Vergleich wurden HEK-Zellen, die vor dem Reverse-Transkriptase-Schritt mit RNase A behandelt worden waren, eingesetzt. Als Standard wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker VI (St, siehe Abbildung) von Boehringer Mannheim eingesetzt. Die Fragmente zwischen 1230 und 154 Basenpaaren sind gezeigt.

35

(B) HEK und HEK/DN-Zellen wurden in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 μ M PMA inkubiert. HEK/DN-Zellen sind Zellen, die die dominant negativen Mutante DN der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren.

40

45

50

55

5

Nach vier Stunden wurde das Medium gesammelt, die Proteine präzipitiert und einer Immunoblotanalyse, wie in Fig. 5 beschrieben, unterzogen.

10

(C) Quantitative Analyse des sekretierten APP α . Die radioaktiven Banden gehören zu APP α und wurden quantifiziert, wie in Fig. 5 beschrieben. Die Ergebnisse sind als Prozentwerte des sekretierten APP α in Vergleichs-HEK-Zellen ausgedrückt und als Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz zwischen Kontrollzellen und HEK/DN-Zellen, mit und ohne PMA-Behandlung, wurde durch den ungepaarten Student's t-Test bestimmt (*, P<0,005; **, P<0,001).

15

Ordinate: Sekretion von APP α [Prozentwert der Wirkung in HEK-Zellen].

20

25

15 Die Erfindung wird näher durch die nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Materialien

30

Die Peptide wurden mit dem Festphasenverfahren unter Verwendung von Fmoc-Chemie auf dem 9050 + Millipore Peptidsynthesizer synthetisiert. BB-3103 wurde von der British Biotech zur Verfügung gestellt. Die Antikörper und ihre Quellen waren: Anti-HA-Epitop-IgG (monoklonaler Antikörper Klon 16B12 aus der Maus, BAbCO; polyklonaler Antikörper Y-11 aus dem Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology), Anti-Kaninchchen-Ig-Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper und [³⁵S]-anti-Maus-IgG-Antikörper von Amersham Pharmacia Biotech. Antikörper gegen APP: monoklonaler Antikörper IgG 6E10 aus der Maus von Senter; polyklonaler Antikörper 1736 aus dem Kaninchen und C7 wurden von Dennis J. Selkoe zur Verfügung gestellt. Weitere Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet sind sämtliche Lösungen wässrig.

40

45

30 Tabelle 1:

CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
--------	---

50

EPPS:	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[3-Propansulfonsäure]
-------	--

55

5

PBS:	8g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,0-7,5
PMA:	Phorbol-12-myristat-13-acetat
TBS	8g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 3g/l Tris/HCl; pH 7,0-7,5
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoracetat
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan

10

15

Beispiel 1Reinigung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

20

Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde aus Rindernierenplasma-
membranen nach dem Verfahren von Howard und Glynn (Meth. Enzymology
(1995) 248, Seiten 388 bis 395) bis zur Homogenität aufgereinigt. Nach dem
DEAE-Sephadex-Schritt wurden aktive Fraktionen direkt auf eine Hydroxylapatit-
säule aufgegeben, die mit 20mM Tris/HCl pH 7, 0,1 mM K₂HPO₄ und 0,3 %
CHAPS äquilibriert worden war. Aktives Enzym wurde mit 51 mM Kaliumphos-
phat pH 7,0 eluiert. Eine Analyse Enzymaktivität enthaltener Proteinfraktionen
mit SDS-PAGE ergab ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 62.000.
Aminoterminalc Sequenzanalyse ergab eine Aminosäuresequenz von
TTVXEKNTXQLYIQTDXXFF, die identisch mit der von Rinder-MADM ist
(Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50) ebenfalls bekannt als
ADAM 10 (Wolfswerk et al. (1995) J. Cell Biol. 131, Seiten 275 bis 278).

25

30

35

Beispiel 2Proteasetestverfahren zur Bestimmung der Substratspezifität:

40

Peptide einer Endkonzentration von 0,3 mM wurden mit 2 µg gereinigten Enzym
in 50 µl 50 mM EPPS pH 8,3, 250 mM NaCl bei 37°C 30 Minuten oder 6 Stunden
inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 2 µl TFA gestoppt. Meßproben wurden mit
Hilfe von HPLC auf einer Vydac (The Separation Group, Hesperia, Calif. USA)
RP 18 Säule (5 µm, 250 x 4,6 mm) analysiert. Die Peptide wurden mit einem Puf-
fersystem von 0,1 % TFA in Wasser (Puffer A) und 0,1 % TFA, 9,9 % Wasser, 90
% Acetonitril (Puffer B) aufgetrennt, wobei der folgende Gradient angelegt wur-
de: 0 % B, 5 Min.; 0 bis 70 % B innerhalb 45 Min. Das Molekulargewicht der

45

50

5

10

Proteolyseprodukte wurde mit ESI-Massenspektrometrie bestimmt. Für die Berechnung der prozentualen Spaltung wurde die Peakfläche, die ein Peptid ergab, das ohne Enzym inkubiert und ansonsten identisch behandelt wurde, als Referenz für 100 % herangezogen.

15

Beispiel 3

Circuardichroismusspektoskopie:

20

CD-Messungen wurden auf einem Jasco J 720 Spektropolarimeter bei 4°C durchgeführt. Die Schichtdicke der Quarzmeßzelle betrug 0,1 mm. Die Messungen wurden bei einer Peptidkonzentration von 0,5 mM in 20 mM Tris/HCl bei pH 8,3, 250 mM NaCl in Anwesenheit von 0,5 % (w/v) SDS durchgeführt. Als Ergebnis wird die Elliptizität $[\theta]$ (deg $\times 10^{-3}$) aufgeführt.

25

Beispiel 4

Klonierung und funktionelle Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM

10:

30

PCR-Primer, die auf die Nukleotidsequenz mit der GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961 passen, wurden benutzt, um die cDNA der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind aus einer Rindernieren-cDNA-Bibliothek zu amplifizieren. Die cDNA von ADAM 10 wurde ohne das Original-Stop-Codon amplifiziert. Statt dessen wurde eine KpnI-Schnittstelle eingeführt und für die Fusion der ADAM 10-cDNA mit einer synthetischen DNA-Kassette, die für das Influenza-Hämaggglutinin (HA)-Epitop-tag (YPYDVPDYA) codiert, benutzt. Der Vergleich der klonierten Nucleotidsequenz von Rinder-ADAM 10 wurde mit der publizierten Original-Sequenz [Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961)] verglichen und zeigte die folgenden Austausche: C700T, C2122T und C2251T (die Nukleotidkoordinaten entsprechen der Sequenz mit der Zugangsnummer Z21961). Die Austausche verändern nicht die Aminosäurenabfolge.

35

40

45

Zur Expression der carboxyterminal HA-markierten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen BV, Groningen,

50

55

5

10

Niederlande) benutzt. Die stabile Transvektion von HEK-Zellen wurde nach der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik durchgeführt. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde 1 mg/ml Geneticin benutzt. Die Überexpression von ADAM 10 beschleunigte das Wachstum von transfizierten HEK-Zellen nicht.

15

20

25

30

35

Um die dominante negative Mutante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (mit DN bezeichnet, siehe Fig. 7, B) herzustellen, wurde eine Aminosäuresubstitution Alanin für Glutamat bei Position 384 (E384A) mittels PCR-Mutagenese durchgeführt (Die Nummerierung der Aminosäuren in der Angabe E384A bezieht sich auf die publizierte Sequenz der Disintegrin Metalloprotease ADAM 10 des Rindes gemäß Howard et al. (1996) Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961). Die amplifizierte cDNA der ADAM-10-Mutante wurde in pcDNA3 einkloniert und eine DNA-Kassette, die für ein FLAG-Epitop-tag (DYKDDDDK) am 3'-Ende eingefügt. Die korrekte Sequenz aller PCR-Produkte wurde mit Didesoxynucleotid-Sequenzierung überprüft. HEK-Zellen wurden, wie vorstehend beschrieben, transfiziert und selektiert. Um die Expression der ADAM-10-Mutante zu überprüfen, wurde das Protein mit Western Blot Analyse unter Verwendung eines M2 Anti-FLAG-Antikörpers (Kodak) und dem ECL-Detektionssystems (Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen.

40

45

50

Beispiel 5

Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion(PCR):

Gesamt-RNA von MDBK-Zellen (Madin Darby bovine kidney) und HEK-Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen GmbH, Hilden) hergestellt. Zur reversen Transkription der menschlichen und der Rinder-ADAM-10 mRNA wurde ein genau passendes Oligonukleotid für das 3'-Ende der mRNAs benutzt (5'-TGCACCGCATGAAACATC-3'). Die PCR wurde durch Zugabe eines Vorwärtsprimers 5'-GAACAAGGTGAAGAATGTG-3' mit einer Sequenz durchgeführt, die in der menschlichen und in der Rinder-ADAM-10 cDNA identisch ist. Um die Herkunft der amplifizierten Fragmente als revers transkribierte

55

5

mRNA sicherzustellen, wurde RNA vor Zugabe der Reversen Transkriptase in einem Kontrollversuch durch RNase A abgebaut.

10

Beispiel 6

Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

15

Stabil ADAM 10 exprimierende HEK-Zellen und Vergleichszellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sublimiert mit 10 % fötalem Kälberserum, Penicillin (100 Einheiten pro ml), Streptomycin (100 µmg/ml) und 2 mM Glutamin auf Kulturschalen eines Durchmessers von 10 cm bis zur Konfluenz hochgezogen. Die Zellen wurden in 20 Min. auf Eis 1 ml Lysispuffer lysiert (20 mM Imidazol pH 6,8, 0,2 % Triton X-100, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 300 mM Saccharose, 1 mg/ml BSA) in Anwesenheit eines Inhibitors (complete™ Mini, Boehringer Mannheim). Die geklärten Extrakte wurden mit 6,6 µg/ml monoklonalem anti-HA-Antikörper (16B12) und Protein A-Sepharose bei 4°C über Nacht inkubiert. Für Deglycosilierungsexperimente wurden die Immunkomplexe in 100 µl 1 % SDS und 2 % β-Mercaptoethanol 10 min gekocht. Nach Zentrifugation wurde das Eluat mit 2.500 Einheiten PNGase F (New England Biolabs, Inc., Massachusetts. USA) in 50 mM Natriumphosphat PH 7,5, 1,5 % Nonidet-P40 und 0,25 % SDS 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden wie bei Wessel und Flügge (1984) (Anal. Biochem. 138, Seiten 141 bis 143) präzipitiert, mit Hilfe eines 4 bis 12 %-igen NuPAGE-Gels (Novex) getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membranen wurden mit polyclonalem anti-HA-Antikörper (Y-11) bei einer Verdünnung von 1:1.000 inkubiert, gefolgt von einem sekundären anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems.

20

25

30

35

40

45

Beispiel 7

Zelloberflächenbiotinylierungen:

50

Die Zellen wurden bis zur 90 %-igen Konfluenz herangezogen und mit PBS enthaltend 0,3 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce. Rockford. Illinois. USA) 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Überschüssiges Biotinylierungsreagenz wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS entfernt. Die Zellylate wurden mit monoklonalem

55

5

10

15

20

anti-HA-Antikörper wie vorstehend beschrieben immunopräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden von gewaschenen Protein-A- Beads mit 200 µl 100 mM Glycin pH 2,5 und 20 µM kompetierendes HA-Peptid (entsprechend den Aminosäuren 98 bis 108 des Influenza Hämagglutinin-Proteins) eluiert. Die Überstände wurden gesammelt und mit 5 µl 3 M Tris pH 8,9 neutralisiert und mit Streptavidin-Agarose-Beads (Pierce, Rockford, Illinois, USA) zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe von 10 % SDS PAGE analysiert und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Blots wurden wie vorstehend beschrieben analysiert.

10 **Beispiel 8**

Immunoblotanalyse:

25

30

35

40

45

8·10⁵ HEK und HEK-ADAM10-Zellen (HEK-Zellen, die ADAM 10 stabil exprimieren, Verfahren wie oben) wurden auf 5 cm Zellkulturschalen, die mit Poly-L-Lysin behandelt worden waren, ausgesät und fast bis zu Konfluenz hochgezogen. Das Medium wurde verworfen und die Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit der aufgeführten Verbindung 4 Stunden in Serum-freien DMEM mit 10 µg/ml Fettäure-freiem BSA inkubiert. Das Medium wurde gesammelt und die Proteine mit 10 % (v/v) TCA präzipitiert. Die Proben wurden bei 14.000 UpM zentrifugiert und die Pellets zweimal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Die Proteine wurden mit 7,5 % SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membranen wurden mit monoklonalem Antikörper 6E10, der die aminotermrale Sequenz von Aβ erkennt, bei einer Verdünnung von 1:2.000 gefolgt von einem sekundären [³⁵S]-markierten anti-Maus IgG-Antikörper inkubiert. Die radioaktiven Banden, die APP_α entsprachen, wurden mit Hilfe des Bio-Imaging-Analysers-BAS-1800 (Fuji) quantifiziert. Der Proteingehalt jeder Zellkulturplatte wurde nach Dialyse mit dem Mikro-BCA Proteinassay (Pierce, Rockford, Illinois, USA) bestimmt und die Meßwerte der radioaktiven Banden auf die Proteinmenge normiert.

50 **Beispiel 9**

Metabolische Markierung und Immunopräzipitation:

55

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1-10⁶ HEK-Zellen und HEK-ADAM10-Zellen wurden wie oben beschrieben auf 10 cm Zellkulturplatten hochgezogen. Die fast konfluenten Zellkulturen wurden in Serum-freien und Cystein- und Methionin-freiem DMEM 1 Stunde inkubiert, und dann in demselben Medium mit 0,2 mCi/ml Tran[³⁵S]-labelTM (ICN) 5 Stunden markiert. Die Immunopräzipitationen wurden ausgeführt, wie in Haass et al. (1991) (J. Neurosci. 11, Seiten 3.783 bis 3.793) und Haass et al. (1992) (Nature 359, Seiten 322 bis 325) beschrieben. APPS α wurde mit dem α -Sekretase-spezifischen polyklonalen Antikörper 1736 und das 10 kDa-Fragment (p10) mit dem polyklonalen Antikörper C7, der den carboxyterminalen Teil von APP erkennt, immunpräzipitiert. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe des Bio-Imaging-Analysers BAS-1800 (Fuji) detektiert.

Beispiel 10

Spezifität der gereinigten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 für verschiedene Peptidsubstrate.

Als Peptidsubstrat, das die α -Sekretase-Schnittstelle umfaßt, wurde die Octapeptid-Aminosäuresequenz 11 bis 28 von A β gewählt (die Numerierung bezieht sich auf den Aminoterminus des β -Amyloid-Peptids (Esch et al. (1990) Sience 248, Seiten 1122 bis 1124 und Haass et al. (1992) Nature 359, Seiten 322 bis 325). Seine carboxyterminale Aminosäure entspricht der ersten extrazellulären Aminosäure von APP. Nach 30 min Inkubation von A β (11-28) mit ADAM 10 zeigte die HPLC-Analyse eine Spaltungsausbeute von 28 % bezogen auf das Startpeptid und unter Bildung von zwei Proteolyseprodukten (siehe Tabelle 2).

Die ESI-massenspektrometrische Analyse identifizierte die Proteolyseprodukte als das aminotermrale Hexapeptid ([M+H]⁺-Ion mit m/z von 777,5) und als das carboxyterminale Dodecapeptidamid ([M+H]⁺-Ion mit m/z von 2.082,8) des ursprünglichen Octadecapeptidamids. Folglich spaltet die Disintegrin-Metalloprotease ADAM-10 proteolytisch zwischen Lys 16 und Leu 17 (Nummerierung beginnend mit dem Aminoterminus von A β), wie es für ein Enzym mit α -Sekretaseaktivität zu erwarten ist. Nach 6-stündiger Inkubation waren 69 % des

5

A β (11-28) vorwiegend an dieser Seite gespalten, seltener erfolgte eine Spaltung hinter Leu 17 und Val 18 (FIG. 3 A; Tabelle 2).

10

Anschließend wurde überprüft, ob die Spaltungshäufigkeit wie für die Spaltung von APP durch die α -Sekretase beschrieben worden ist (siehe Sisodia (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, Seiten 6075 bis 6079) von der Konformation des Substrats abhängt. Zu diesem Zweck wurde Alanin 21 in A β (11-28) durch Lysin ersetzt. Diese Position entspricht einer natürlich vorkommenden Ala \rightarrow Gly-Mutation bei Position 692 von APP₇₇₀ (Hendricks et al. (1992) Nat. Genet. 1, Seiten 218 bis 221), die in Patienten mit zerebraler Hämorrhagie in Folge von Amyloidangiopathic identifiziert wurde (Haass et al (1994) J. Biol. Chem. 269, Seiten 17741 bis 17748; Capell et al. (1996) Amyloid 3, Seiten 150 bis 155).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Cirkulardichroismus-Messungen (CD) des Octadecapeptidamids A β (11-28) in 0,5 % SDS zeigten ein Spektrum, das charakteristisch für die α -helicale Konformation ist, während eine Zufallsknäul-Konformation im Falle des Peptids mit dem Austausch Ala \rightarrow Gly in Position 21 von A β (11-28) (siehe FIG. 3 B) beobachtet wurde. Das letzte Peptid wurde durch die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 weniger effektiv als das Wildtyp-Peptid gespalten: Nach 30 Min. wurde nur 14 % zwischen Lys 16 und Leu 17 gespalten, verglichen mit 28 % im Falle von A β (11-28) (siehe Tabelle 2). Ein Vergleichsbeispiel zeigt, daß ADAM 10 nicht die Peptidsubstrate spaltet, die eine Schnittstelle für das sog. *Ectodomain Sheding*, das Abwerfen einer Außendomäne, des Angiotensin umwandelnden Enzyms (ACE) (Ehlers et al (1996) Biochemistry 35, Seiten 9549 bis 9559) oder des Interleukin-6-Rezeptors (Müllberg et al. (1994) J. Immunol. 152, Seiten 4958 bis 4968), besitzen. Allerdings spaltet ADAM-10 offensichtlich ein von pro-TNF- α abgeleitetes Peptidsubstrat, wie neulich berichtet wurde (Lunn et al. (1997) FEBS Lett. 400, Seiten 333 bis 335; Rosendahl et al (1997) J. Biol. Chem. 272, Seiten 24588 bis 24593). Einige Metalloproteinase-Inhibitoren wurden auf ihre Fähigkeit, die proteolytische Spaltung von A β (11-28) durch gereinigtes ADAM 10 zu inhibieren, getestet. Der auf einer Hydroxamsäure basierende Inhibitor BB-3103 (Middehoven et al. (1997) FEBS Lett. 414, Seiten 14 – 18) inhibierte bei einer Kon-

5

zentration von 100 μ M vollständig die proteolytische Spaltungsaktivität. Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde auch durch 1 mM DTT vollständig 10 inhibiert, was darauf schließen läßt, daß eine Thiol-Gruppe oder Disulfidbindungen wichtig für die α -Sekretaseaktivität sind. Ferner inhibierte ADAM-10 1 mM

5 1,10-Phenanthrolin.

15

Beispiel 11

Prozessierung und Lokalisation der Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen

20

Um die Wirkung der Metalloprotease ADAM 10 auf die proteolytische Spaltung

10 von APP in einem Zellsystem zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen eingesetzt. Die cDNA der Metalloprotease ADAM 10 wurde aus einer Rindernieren 20 cDNA-Bibliothek kloniert, an ihrem 3'- mit einer DNA-Sequenz, die für das HA-Antigen kodiert, versehen und in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) kloniert. Nach der Transfektion von HEK-Zellen und

25

15 HEK-Zellen, die APP₆₉₅ stabil exprimieren [HEK APP₆₉₅, Haass et al. (1992), Nature 359, Seiten 322 – 325], mit Nukleinsäure, kodierend für die Metalloprotease ADAM 10, wurden Klone auf die Expression und Prozessierung der Metalloprotease hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zelllysate mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper (16B12) präzipitiert mit SDS-PAGE analysiert und

30

20 einem Western Blot unterzogen. Immuno-Anfärbungen mit einem anti-HA-polyklonalen Antikörper zeigten 2 immunreaktive Spezies einer apparenten Größe von 90 kDa und 64 kDa (Fig. 4 A, Spuren 2 – 5). Die 64 kDa-Variante wird aus der 90 kDa-Variante durch Abspaltung der Pro-Domäne (194 Aminosäuren) gebildet. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Furin-ähnliche Pro-

35

40 Proteinkonvertase, die die Disintegrin-Metalloproteasen bei dem Sequenzmotiv RXKR in einem späten Golgi-Kompartiment spaltet (Lum et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 26236 – 26247). Die berechnete Molekularmasse der Metalloprotease ADAM 10 nach der protolytischen Abspaltung der Prodomäne ist 61 45 kDa. Um zu untersuchen, ob die Differenz zwischen apparenten und berechneten 50 Molekulargewicht auf die Glycosilierung an den putativen N-Glycosilierungsstellen der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 zurückzuführen ist (Howard et al. 1996) Biochem. J. 317, Seiten 45 – 50), wurden die Glyco-

55

5

proteine des Zellklons mit dem höchsten Expressionsspiegel an Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (HEK-ADAM 10) mit N-Glycosidase F behandelt.
10 Diese Behandlung führte zu einer Reduktion der Molekularmasse auf die erwarteten Werte von etwa 86 kDa für das Vorläuferprotein und von 61 kDa für die
5 prozessierte Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10, der die Prodomäne fehlt (Fig. 4 A, Spur 3).
15

Die Lokalisation der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in transfizierten HEK-Zellen wurde durch Zelloberflächen-Biotinylierung und konfokale Mikroskopie untersucht. Zur Biotinylierung wurden die Zellen auf 4°C gekühlt und 30 Minuten mit Sulfo-NHS-LC-Biotin, einem membranimpermeablen Biotinylierungsreagenz, inkubiert. Die Immunopräzipitation wurde unter Verwendung eines monokonalen Anti-HA-Antikörpers durchgeführt. 4/5 der gesammelten Immuno-
20 präzipitate wurden mit immobilisiertem Streptavidin inkubiert, um die Protease-
moleküle an der Plasmamembran zu isolieren. Fig. 4 B zeigt die Anwesenheit von sowohl der prozessierten etwa 64 kDa großen Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 als auch ihres 90 kDa großen Vorläufers auf der Zelloberfläche (Spur A). 1/5 des Immunopräzipitates, das nicht mit Streptavidin
25 inkubiert worden war, zeigte vornehmlich die nicht-prozessierte 90 kDa große Variante, und eine nur schwache Bande wies auf die proteolytisch aktivierte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 hin (Spur B). Diese Ergebnisse zeigen, daß die proteolytisch aktivierte Form der Metalloprotease ADAM 10 vornehmlich an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wo sie in der Lage ist APP proteolytisch zu spalten. Der überwiegende Teil der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 liegt
30 intrazellulär als Proenzym vor. Eine Analyse der Lokalisation der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit Hilfe von konfokaler Immunofluoreszenzmikroskopie an permiabilisierten HEK-ADAM 10 Zellen zeigte, daß das Anfärbemuster größtenteils mit dem des Golgi-assoziierten Markers 58k überlappt (Ergebnisse
35 nicht gezeigt).
40

45

Beispiel 12

50

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Wirkung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auf die α -Sekretase Spaltung von APP in HEK-Zellen.

Die α -Sekretaseaktivität in HEK-ADAM 10 Zellen wurde mit der Aktivität, die in untransfizierten HEK-Zellen gefunden wurde, verglichen. Die Freisetzung von APPs in das Medium wurde mit zwei bindungsortsspezifischen Antikörpern (1736 und 6E10) bestimmt. Beide Antikörper erkennen die aminotermrale Sequenz von A β und detektieren daher nur APPs α aber nicht APPs β . Immunoblotexperimente und Immunopräzipitation nach metabolischer [35 S]-Markierung wurden durchgeführt, um die α -Sekretaseaktivität zu quantifizieren (Fig. 5 und Fig. 6). Die quantitative Analyse der Immunoblotexperimente mit dem monoklonalem Antikörper 6E10 zeigte, daß HEK-Zellen, die stabil einen hohen Spiegel der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren, ungefähr die vierfache Menge APPs α ins Medium abgeben als die untransfizierten HEK-Zellen (Fig. 5, Spuren 1-4). Eine erhöhte α -Sekretaseaktivität wurde auch in einem HEK-APP₆₉₅-Zellklon, der stabil die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimiert, festgestellt. Der relative Anstieg von APPs₇₅₁ α , welches von endogenem APP abstammt und von APPs₆₉₅ α war nur zweifach (Fig. 5A, Spuren 7 und 8) infolge des geringeren Expressionsspiegels der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (Fig. 4, Spur 5) und infolge des höheren Substrat-Enzymverhältnisses.

Neulich wurde gezeigt, daß Zink-Metalloproteaseinhibitoren auf der Basis von Hydroxamsäure das *Ectodomain Shedding* verschiedener Membranproteine einschließlich der α -Sekretase-Spaltung von APP unterdrücken. Ein Effekt auf die Freisetzung von APPs β wurde nicht gefunden (Parvathy et al. (1998) Biochemistry 37, Seiten 1680-1685). Deswegen wurde der Effekt des Hydroxamsäureinhibitors BB-3103 auf HEK-Zellen und auf HEK-Zellen, die die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 überexprimieren, untersucht. BB-3103 verminderte die Freisetzung von APPs α in HEK-Zellen um etwa 40 % (Fig. 5, Spuren 1-3) und in HEK-ADAM 10-Zellen um etwa 70 % (Fig. 5, Spuren 4-6). Die Stimulation der Proteinkinase C durch Phorbolester verstärkt deutlich die Freisetzung von APPs α und inhibiert die Sekretion von A β . Um die Wirkung der Proteinkinase C

55

5

auf die Stimulierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Aktivität zu untersuchen, wurden HEK- und HEK-ADAM 10-Zellen mit 1 µm PMA behandelt.
10 Immunoblotexperimente zeigten, daß PMA die APP α -Freisetzung von HEK-Zellen etwa um das 6-fache erhöht (Fig. 5, Spuren 1 und 2). Die verstärkte α -Sekretaseaktivität von HEK-ADAM 10-Zellen wurde um den Faktor 2,5 vergrößert (Fig. 5, Spuren 4 und 5).
15

ADAM 10 besitzt in Aminosäureposition 719 ein Threonin, welches als Substrat für eine Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung dienen kann. Eine Verstärkung der α -Sekretaseaktivität von ADAM 10 durch den Proteinkinase C-Aktivator PMA erfolgt offensichtlich über diesen Mechanismus.
20

Ähnliche Ergebnisse wurden in Immunopräzipitationsexperimenten mit dem polyklonalen Antikörper 1736 erhalten. Die Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen verstärkte signifikant die Sekretion von APP α in das Medium (Fig. 6A). Um zu bestimmen, ob die Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auch den Spiegel von p10 erhöht, wurden Zellsäfte von HEK- und HEK-ADAM 10-Zellen nach metabolischer Markierung mit dem polyklonalen Antikörper C7, der den carboxyterminalen Teil von APP erkennt, immunopräzipitiert. Wie in Fig. 6B und 6C gezeigt, wird die Expression von Holo-APP (APP der vollen Länge) nicht verändert, während das Signal von p10 in HEK-ADAM 10-Zellen signifikant stärker ist als in den Vergleichszellen. Dies zeigt, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 α -Sekretaseaktivität besitzt.
25
30
35
40

Beispiel 13

45 Wirkung der dominant negativen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Mutante auf die α -Sekretaseaktivität:
50 50 Um festzustellen, ob das menschliche Homologe der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen exprimiert wird und daher für die endogene α -

5

10 Sekretaseaktivität verantwortlich ist, wurden Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktionsanalysen unter Verwendung von Gesamt-RNA aus diesen Zellen und Oligonucleotiden, die spezifisch für ADAM 10 sind, durchgeführt. Wie in Fig. 7A gezeigt, exprimieren HEK-Zellen detektierbare Mengen an 15 mRNA, die für die humane Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 codiert, die 97 % Identität auf Aminosäureebene mit der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind zeigt. In einem Vergleichsexperiment wurde die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-mRNA in Gesamt-RNA von MDBK-Zellen nachgewiesen, von denen bekannt ist, daß sie die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren (Howard et al. (1996) Biochem. J. 317, Seiten 45-50).

20 Um die endogene α -Sekretaseaktivität in HEK-Zellen zu inhibieren, wurde die 25 Punktmutation E384A in die Zink-Bindungsstelle der Rinder-Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 eingeführt. Eine Mutante des KUZ-Proteins mit einer 30 Mutation an derselben Stelle verhielt sich dominant negativ in *Drosophila melanogaster* (Pan und Rubin (1997) Cell 90, Seiten 271-280). HEK-Zellen, die die Mutante ADAM 10 E384A (HEK/DN) exprimieren, zeigten eine deutlich verminderte Sekretion von APPs. Der inhibitorische Effekt war am deutlichsten in 35 PMA-behandelten Zellen: Nur 25 % der enzymatischen Aktivität wurde festgestellt (Fig. 7B, Spuren 2 und 4; Fig. 7C). Folglich führte diese Punktmutation zu einer dominant negativen Form der Protease und zu einer deutlich verminderten konstitutiven und stimulierbaren α -Sekretaseaktivität.

40 Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die Disintegrin-Metalloprotease 45 ADAM 10 α -Sekretaseaktivität besitzt und in den basalen und stimulierten Prozeß des *Ectodomain Sheddings* von APP involviert ist. Diese Folgerung ergibt sich im wesentlichen aus folgenden experimentellen Ergebnissen:

50 30 - Die Überexpression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen führt zu einem Anstieg von APP α und p10 um ein vielfaches. Der Anstieg in der Proteolyseaktivität (*Shedding-Aktivität*)

55

5

10

korreliert mit dem Expressionslevel der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10. Die verstärkte α -Sekretaseaktivität kann durch Stimulation der Proteinkinase C mit Phorbolestern erhöht werden, was ein charakteristisches Merkmal der α -Sekretase ist (HUNG et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, Seiten 22959-22962).

15

5 Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimente zeigen, daß die proteolytisch aktivierte Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 im wesentlichen in der Plasmamembranen lokalisiert ist.

20

10 - Die endogene basale und Phorbolester stimulierte α -Sekretaseaktivität in HEK-Zellen kann durch eine dominant negative Form der Disintegrin Metalloprotease ADAM 10 deutlich inhibiert werden.

25

15 - Das Inhibitorspektrum sowohl des isolierten als auch des überexprimierten Enzyms stimmt mit den Berichten über die Hemmung der α -Sekretaseaktivität überein.

30

Auf die Veröffentlichung Lammich et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA (1999) 96, 20 3922-7 wird vollinhaltlich verwiesen.

35

40

45

50

55

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 2

Protein	Sequenz	% Spaltung durch Rinder-ADAM		
		30 min	10 nach 6 h	
Pro-TNF	PLAQ \downarrow A \downarrow VRSSSSRTPSD-NH ₂	49	100	
β -Amyloidvorläuferprotein	EVHHQK \downarrow LVFFAEDVGSNK-NH ₂ EVHHQK \downarrow LVFFGEVDVGSNK-NH ₂	28	69	
IL-6-Rezeptor	ANATFLPVQ \downarrow DSSSV-NH ₂	14	54	
Angiotensin II-mwan- dchdes Enzym	TPNSAR \downarrow SEGPLPDSGR-NH ₂	0	0	

Claims

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Patentansprüche

1. Rekombinante Zelle, die ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
 - a) entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promoters stehen, - b) oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.
2. Rekombinante Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend entweder
 - a) mindestens ein Gen für ein Substratprotein, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
 - b) mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promoters stehen,
oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.
3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteaseprotein die Di-

5

sintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Maus ist.

- 10 4. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteaseprotein die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Ratte ist.
- 15 5. Rekombinante Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie rekombinante Nukleinsäure(n) enthält, die codieren:
 - c) für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier und
 - d) gegebenenfalls für ein Substratprotein gemäß Anspruch 2.
- 20 6. Zelle, nach Anspruch 5, wobei es sich bei der dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 um die Mutante E384A der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind oder um eine entsprechende Mutante aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier handelt.
- 25 7. Zelle nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Substratprotein ein Fusionsprotein ist, bei dem der aminotermrale Sequenzbereich des Fusionsproteins von einem Markerprotein, einem Enzym oder einem katalytisch wirksamen Teil eines Enzyms und der carboxyterminale Sequenzbereich des Fusionsproteins von dem humanen Amyloidvorläuferprotein oder einem Teil des humanen Amyloidvorläuferproteins gebildet werden.
- 30 8. Zelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Enzym um eine um mindestens 24 Aminosäurereste carboxyterminal verkürzte alkalische Phosphatase SEAP handelt.
- 35 9. Zelle nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Substratprotein eine Sequenz gemäß SEQ ID-No:1 aufweist.
- 40 10. Verfahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte
 - e) Bereitstellung eines Substratproteins gemäß Anspruch 2,
 - f) Bereitstellung eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 2,
 - 45 g) Applikation einer Testsubstanz auf eine Zelle, auf eine Zellfraktion oder auf ein Gemisch von Zellfraktionen, die jeweils sowohl das Substratprotein als auch das Protea-

55

5

seprotein umfassen, und

10 h) Quantitative Bestimmung eines seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

11. Verfahren zur Auffindung von weiteren Sekretasen oder von pharmazeutischen Wirkstoffen, umfassend die folgenden Schritte

15 d) Expression eines Substratproteins und einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier in einer Zelle gemäß Anspruch 5 oder 6.

20 e) Expression eines weiteren Testproteins in der Zelle und/oder Applikation einer Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle, und

f) Quantitative Bestimmung eines gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen enzymatischen Test erfolgt, bei dem von der katalytischen Aktivität einer Probe auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird.

30 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen spektroskopischen Test erfolgt, bei dem von der spektroskopischen Eigenschaft einer Probe auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird.

35 14. Verwendung von Substanzen, die von der Zelle gebildete Proteinmenge oder die enzymatische Aktivität eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2 beeinflussen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer*.

40 15. Verwendung eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2 zur proteolytischen Spaltung eines Substratproteins gemäß Anspruch 1 oder 2.

45 16. Verwendung einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier oder einer Nukleinsäure, codierend für eine dieser dominant negativen Formen, zur Unterdrückung der α -Sekretaseaktivität einer Zelle.

50 17. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbe-

55

5

sondere für *Morbus Alzheimer*, dadurch gekennzeichnet, daß

10

- c) eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz *genspezifischer* Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der PCR-Analyse unterworfen wird,
- d) und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der huma-
- nen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen wird.

15

18. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbe-

sondere für *Morbus Alzheimer*, durch quantitative Bestimmung der mRNA-Mengen von humanem ADAM 10 aus Zell- und Gewebeproben, umfassend einen der folgenden Schritte:

20

- d) Isolierung und Quantifizierung der ADAM 10-mRNA,
- e) Einzel- oder doppelsträngige cDNA die ADAM 10-mRNA umgeschrieben wird welche dann quantifiziert wird,
- f) die ganze Nukleotidsequenz von ADAM 10 oder Teile davon zur Quantifizierung mittels Hochdurchsatz-Expressionsanalyse (z.B. DNA-Chip-Technologie u. DNA-Micro-Array) eingesetzt wird.

30

19. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbe-

sondere für *Morbus Alzheimer*, dadurch gekennzeichnet, daß die tatsächliche chromoso-

malen Lokalisierung des Gens der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit seiner normalen chromosomalen Lokalisierung, Chromosom 15 bei 12.44 cR₃₀₀₀, verglichen wird.

40

20. Arzneimittel, enthaltend eine rekombinante Nukleinsäure, die für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 codiert.

45

21. Arzneimittel, enthaltend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure

50

22. Arzneimittel, umfassend die nicht-membranverankerte lösliche Form eines Proteasepro-

teins gemäß Anspruch 1 oder 2, insbesondere die lösliche Form von humanem ADAM 10.

23. Antikörper oder Antikörperderivate, die ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2

55

5

spezifisch binden.

10 24. Verfahren zur Bestimmung des Aktivitätszustands von humanem ADAM 10 durch Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von humanem ADAM 10 in Zell- und Gewebe-
proben, wobei entweder
15 c) ADAM 10 isoliert wird und sein Phosphorylierungsgrad entweder durch Massenspektrometrie, durch spezifische Anti-Phosphothreonin-Antikörper, durch Quantifizierung der Aminosäure Phosphothreonin oder durch Dephosphorylierung (Phosphatase-Assay) von ADAM 10 bestimmt wird, oder
20 d) Zell- oder Gewebeproben direkt in eine Proteomanalyse eingesetzt werden und der Nachweis von phosphoryliertem ADAM 10 wie unter Punkt a) beschrieben erfolgt.

25 25. Transgenes nicht-menschliches Tier, das rekombinante Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier aufweist.

30 26. Verwendung einer rekombinaten Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier zur Erzeugung transgener Zellen und transgener nicht-menschlicher Tiere und zur Gentherapie.

35 27. Transgenes nicht-menschliches Tier, aufweisend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure.

40 28. Verwendung einer zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure zur Erzeugung von transgenen Zellen und transgenen nichtmenschlichen Tieren und zur Gentherapie.

45

50

55

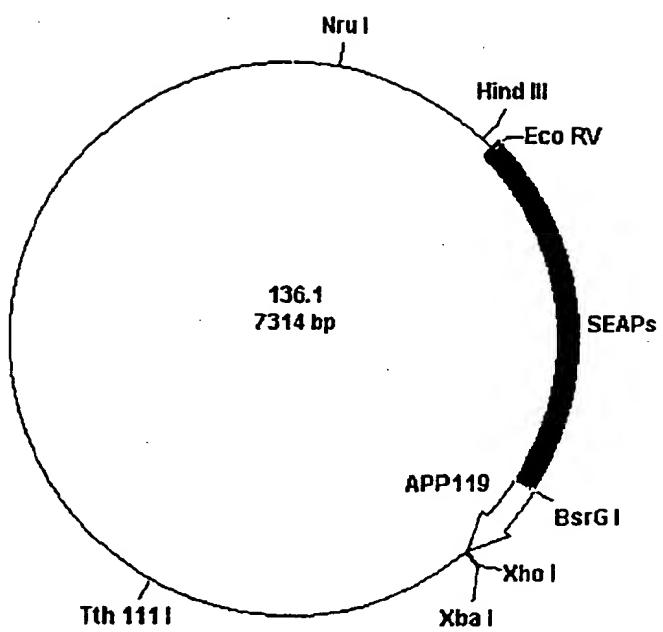


Fig.1

136.1 = pcDNA3-SEAPs/APP119

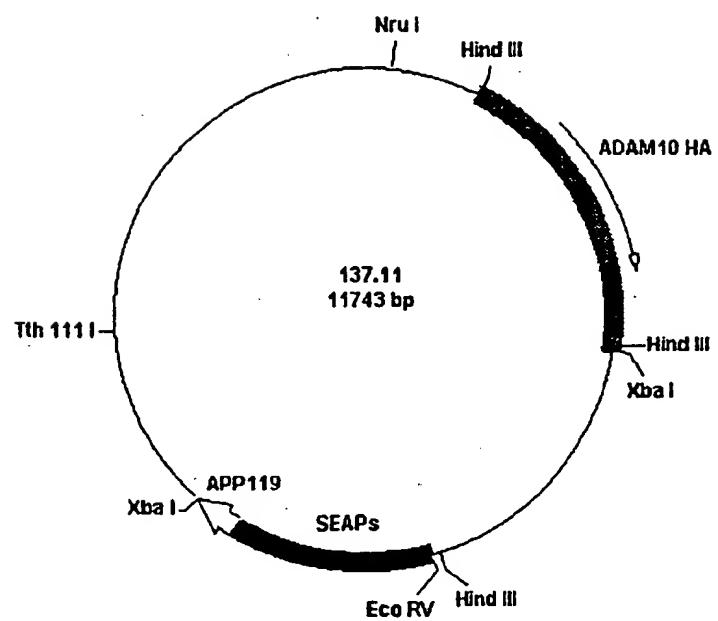


Fig.2

137.11 = pcDNA3-SEAPs/APP119_ADAM10-HA

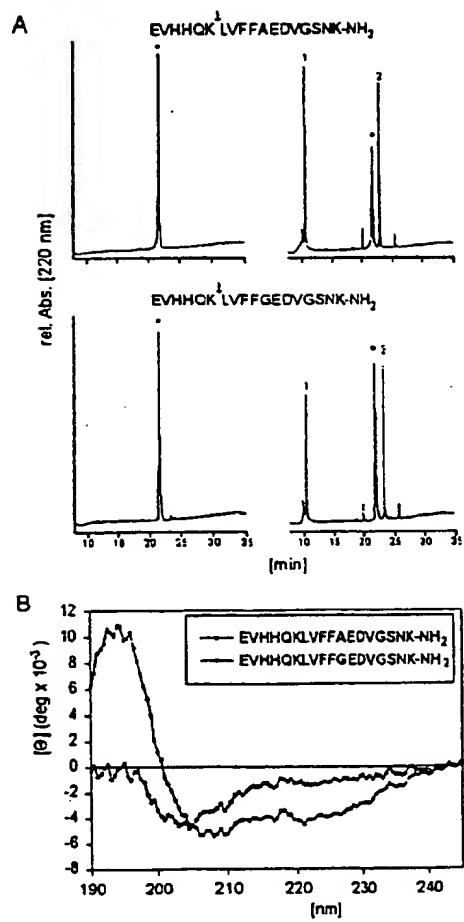


Fig. 3

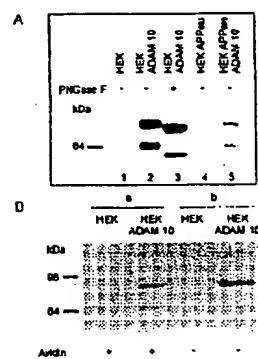


Fig.4

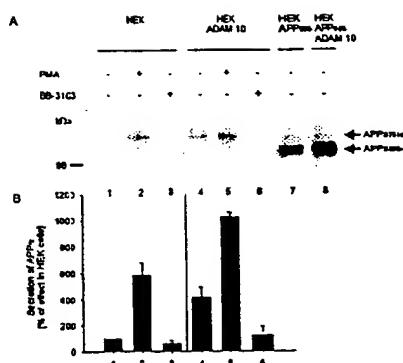


Fig. 6

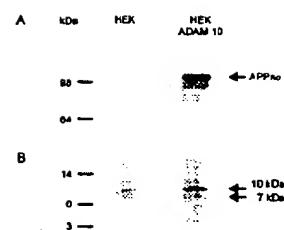
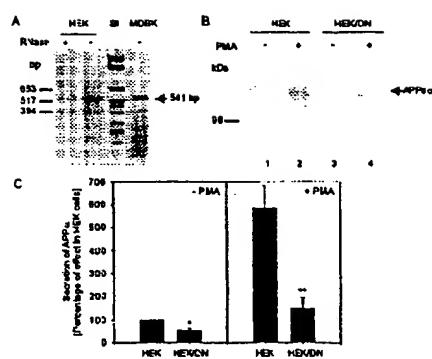


Fig. 6



SEQUENZPROTOKOLL**ALLGEMEINE ANGABEN:****ANMELDER:**

NAME: Professor Falk Fahrenholz
STRASSE: Becherweg 39
BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 55099
TELEFON: 06131395933
TELEFAX: 06131395348

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Zellen, die ein Amyloidvorläuferprotein und eine alpha- Sekretase coexprimieren, ein Testverfahren zur Identifikation aller-Sekretase-aktiver Substanzen sowie eines zur Identifikation weiterer Sekretasen, ein Testverfahren zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber Morbus Alzheimer und Verwendung von Nukleinsäuren, die für eine alpha-Sekretase codieren, für die Gentherapie

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

COMPUTERLESBARF FASSUNG:
DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM-kompatibel
BETRIEBSYSTEM: WINDOWS NT
SOFTWARE: WORD97

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LANGE: 627 Aminosäuren
ART: Aminosäure
TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Protein

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-No:1:

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser
5 10 15
Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn
20 25 30
Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro
35 40 45
Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly
50 55 60
Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln
65 70 75
Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg
80 85 90
Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His
95 100 105
Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val
110 115 120
Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe
125 130 135
Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met
140 145 150
Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gln Val Val Thr Thr
155 160 165
Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His Thr
170 175 180
Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala
185 190 195
Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn
200 205 210
Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe
215 220 225
Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln
230 235 240
Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu
245 250 255
Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu
260 265 270
Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu
275 280 285
Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr
290 295 300
Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu
305 310 315
Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly
320 325 330
Arg Ile Asp His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu
335 340 345
Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln
350 355 360
Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His
365 370 375
Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser
380 385 390

Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr
 395 400 405
 Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp
 410 415 420
 Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu
 425 430 435
 Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala
 440 445 450
 Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 455 460 465
 Val His Gly Val Gln Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala
 470 475 480
 Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro
 485 490 495
 Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Val Tyr Thr Arg
 500 505 510
 Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu
 515 520 525
 Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 530 535 540
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn
 545 550 555
 Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 560 565 570
 Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Gln Tyr
 575 580 585
 Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr
 590 595 600
 Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu
 605 610 615
 Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 620 625

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 LANGE: 1884 Basenpaare
 ART: Nucleinsäure
 STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-Nr:2:

ATGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCTGGGCCGT AGGCTACAGC TCTCCCTGGG CATCATCCCA	60
GTGAGGAGG AGAACCCGGA CTTCTGGPAC CGCGAGGCAG CCGAGGCCCT GGGTGCGGCC	120
AAGAAGCTGC AGCCTSCACA GACAGCCCCC AAGAACCTCA TCATCTTCCT GGCGGATGGG	180
ATGGGGGTGT CTACGSTGAC AGCTGCCAGG ATCCTAAAG GGCAGAAGAA GGACAAACTG	240
GGGCCTGAGA TACCCCTGGC CATGGACCGC TTCCCATATG TGGCTCTGTC CAAGACATAC	300

AATGTAGACA AACATGCGCC AGACAGTGGG GCCACAGCCA CGGCCTACCT GTGGGGGTC 360
AAGGGCAACT TCCAGACCAT TGGCTTGAGT GCAGCGGCC GCCTTACCA GTGCAACACG 420
ACACGCGGCCA AGCAGGTCTAT CTCCGTGATG AATCGGGCCA AGAAASCAGG GAGTCAGTG 480
GGAGTGGTAA CCACCRCAAG ATGCGACAC GCCTCGCCAG CGGGCACCTA CGCCCACACG 540
GTGAACGCCA ACTGCTACTC GGACGCCGAC GTGCTGCCCT CGGGCCGCCA GGAGGGGTGC 600
CAGGACATCG CTACSCAGCT CATCTAAC ATGGACATG ACGTGATCCT AGGTGGAGGC 660
CGAAAGTACA TGTTTCGGCAT GGGAAACCCA GACCTTGAGT ACCCAGATGA CTACAGCCAA 720
GGTGGGACCA GGCTGGACGG GAAGAATCTG GTGAGGAAT GGCTGGCGAA GCGCCAGGGT 780
GCCCGGTATG TGTGGAACCG CACTGAGCTC ATSCAGGCTT CCCTGGACCC GTCTGTGACC 840
CATCTCATGG GTCTCTTGA GCCTGGAGAC ATGAAATCG AGATCCACCG AGACTCCACPA 900
CTGGACCCCT CCCTGATGGA ATGACAGAG GCTGCCCTGC GCCTGCTGAG CAGGAACCCC 960
CGCGSCTCTC TCCCTCTGGT GGAGGGTGGT CGCATCGACCC ATGGTCATCA TGAAAGCAGG 1000
GCTTACCGGG CACTGACTGA GACGATCATG TTCGACCGAG CCATTGAGAG GGCGGGCCAG 1060
CTCACCAAGCG AGGAGGACAC GCTGAGCCTC GTCACTGCC ACCACTCCCA CGTCTCTCC 1120
TTCGGAGGCT ACCCCCTGGG AGGGAGCTCC ATCTTCGGGC TGGCCCTGG CAAGGCCCCG 1180
GACAGGAAGG CCTACACGGT CCTCCTATAAC GGAAACGTC CAGGATATGT GCTCAAGGAC 1240
GGCGCCCGGC CGGATGTTAC CGAGAGCGAG AGCGGGAGTC CGGAGTATCG GCAGCAGTC 1300
GCAGTGCCCC TGGACGAAGA GACCCACGCA GGCGAGGAGC TGCGGGTGT CGCGCGCGGC 1360
CCGCAGGCGC ACCTGGITCA CGGCGTGCAG GAGCAGACCT TCATAGCGCA CGTCATGGCC 1420
TTCGCCGCT GCCTGGAGCC CTACACCGCC TGCGACCTGG CGCCCCCGC CGGCACCAACC 1480
GACGCCGCGC ACCCGGGGGT GTACACTCGA CCAGGTTCTG GGGTGAACAA TATCAAGACG 1540
GAGGAGATCT CTGAAGTGAA GATGGATGCA GAATTCCGAC ATGACTCAGG ATATGAAGTT 1600
CATCATCAA AATGGGTGT TTTCGAGAA GATGTGGTT CAAACAAAGG TGGCATCATT 1660
GGACTCATGG TGGCGGTGT TGTCAATAGCG ACAGTGTATCG TCATCACCTT GGTGATGCTG 1720
AAGAAGAAC AGTACACATC CATTCAATCG GGTGTGGTGG AGGTTAACGC CGCTGTCACC 1780
CCAGAGGAGC GCCACCTGTC CAAGATGCAG CAGAACGGCT AGCAAAATCC AACCTACAG 1860
TTCTTGAGC AGATGCAGAA CTAG